

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Claude FISCHER

Sujet de la Thèse :

**Nouveaux dérivés du désoxy-2'D-ribose. Recherches sur les
réactions de couplage nucléoside-polypeptide**

SOUTENUE LE 26 JUIN 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. S. DAVID : PRÉSIDENT

H. KAGAN
L. SZABO

} EXAMINATEURS

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Claude FISCHER

Sujet de la Thèse :

**Nouveaux dérivés du désoxy-2'D-ribose. Recherches sur les
réactions de couplage nucléoside-polypeptide**

SOUTENUE LE 26 JUIN 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. S. DAVID : PRÉSIDENT

H. KAGAN
L. SZABO } EXAMINATEURS

THESE

PRESENTED

TO THE FACULTY OF THE UNIVERSITY OF LEIDEN

IN CANDIDACY FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

BY

MR. J. VAN DER WOUDE

1884



THESE

1884

THESE

1884

1884

1884

1884

AVANT - PROPOS

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur S. DAVID qui m'a proposé le présent travail et qui m'a toujours prodigué les meilleurs conseils.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur KOGAN et Monsieur SZABO d'avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail et, en particulier, mes camarades de laboratoire.

INTRODUCTION

Lorsqu'un animal est soumis à une ou plusieurs injections parentérales de certaines substances étrangères telles que des protéines, des extraits tissulaires d'autres espèces, des bactéries etc..; il apparaît généralement au bout de quelques jours, dans le sérum, des substances dont la propriété unique est de réagir contre les substances injectées. Ces substances sont appelées anticorps et les substances qui ont stimulé leur formation sont appelées antigènes. L'animal qui a formé des anticorps, après avoir reçu des injections d'un antigène, est dit immunisé.

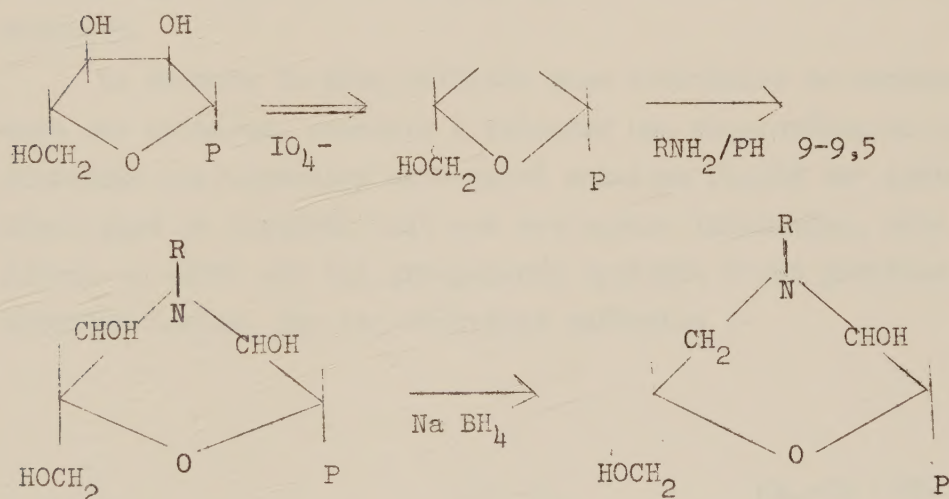
Les anticorps sont des protéines qui appartiennent à la classe des sérum globulines et on a pu montrer qu'un très grand nombre d'anticorps étaient identiques aux gamma globulines normales tant par leur masse moléculaire que par leurs propriétés physicochimiques. D'autres anticorps peuvent avoir des masses moléculaires supérieures et des mobilités électrophorétiques différentes. Un tel anticorps est supposé posséder différents sites dont la configuration est complémentaire du groupement avec lequel il réagit. Ce site complémentaire occupe une relativement faible partie de la molécule d'anticorps et il est permis de penser qu'il se présente sous la forme d'une cavité constituée par les hélices de la molécule de gammaglobuline dont le contour de Vander Waals est complémentaire et sélectif du groupement antigène.

Jusqu'à une époque très récente, l'antigénicité des acides nucléiques et des nucléosides paraissait douteuse et représentait un sujet de controverses. Le rôle exact des différents acides nucléiques dans les différentes étapes de la synthèse des anticorps, était également incertain. Tous ces doutes disparurent rapidement ces dernières années. De nouvelles techniques expérimentales apportèrent la preuve que, sous certaines conditions, les acides nucléiques et les nucléosides sont immunogéniques et que les anticorps ainsi obtenus peuvent fournir d'excellents outils pour l'exploration de la structure moléculaire de l'importante famille des acides nucléiques. Parallèlement, la découverte de l'antigénicité des acides nucléiques et des nucléosides permit de franchir une étape importante dans la compréhension de certains phénomènes d'auto-immunisation et contribua à l'avènement de nouvelles théories quant à la formation des

anticorps. Les acides nucléiques et les nucléosides, sous leurs diverses formes furent reconnus jouer un rôle fondamental dans l'activation des cellules génératrices d'anticorps et surtout comme stimulants non spécifiques dans la formation d'anticorps.

Le but essentiel du travail présenté ici, a été d'obtenir une combinaison stable entre un nucléoside et une protéine pour obtenir l'antigène correspondant. Divers travaux antérieurs au nôtre s'étaient proposé le même but. Ainsi Tannenbaum et ses collaborateurs, par les méthodes habituelles de la chimie hétérocyclique, ont construit une purine (1), l'uracile (2) et l'acétyl-5 uracile (2) sur les groupements aminés terminaux des résidus lysine de la sérum albumine. Ces conjugués ont provoqué chez le lapin, la formation d'anticorps à spécificité purine ou pyrimidine. Deux chercheurs du même groupe ont essayé de cerner de plus près la structure nucléoside, en appliquant une suite de réactions mises au point par Khym (3) dans un autre contexte.

Les auteurs coupaient la liaison $C_2' - C_3'$ du ribose par le périodate et condensaient sur le groupement aminé d'une protéine le dialdéhyde ainsi formé.

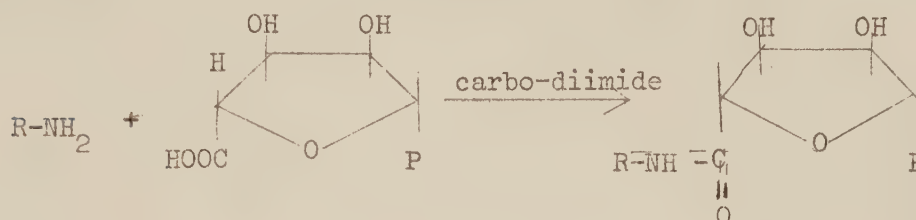


P désigne une purine ou une pyrimidine

De cette manière, ils couplaient les quatre ribonucléosides habituels, l'uridine, la cytidine, l'adénosine, la guanosine et la β -D-ribofuranosyl-1 thymine et obtenaient les antisérums correspondants (4)

Toutefois, il est manifeste que les réactions bouleversent profondément la structure du nucléoside. On s'en approche beaucoup plus dans une méthode publiée par Sela et ses collaborateurs (5) et (6). Sur le squelette

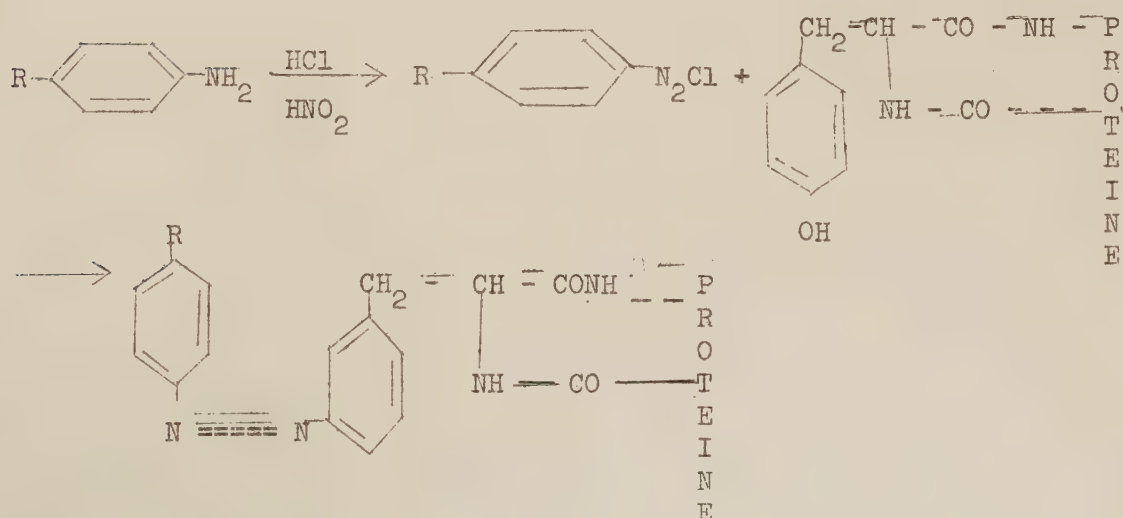
polypeptidique synthétique poly-L-lysine sont greffés des chaînes de poly D-L alanine qui présentent à leurs extrémités le groupement NH_2 terminal. Sur ces groupements sont condensés, au moyen de carbodiimide, les acides carboxyliques 0-5' des nucléosides suivants : uridine, désoxyuridine, thymidine, cytidine, adénosine et guanosine.



Les polypeptides synthétiques ainsi obtenus se sont révélés antigéniques mais d'une spécificité plus ou moins grande.

Quand nous avons commencé notre travail, ces deux dernières publications n'étaient pas encore parues et il nous avait semblé désirable de lier à la protéine une structure aussi proche que possible de celle du nucléoside naturel, même encore plus proche que les "acides nucléosides carboxyliques de Sela" où la suite d'atomes naturels - CH_2O se trouve remplacé par - CO-NH- . D'ailleurs, les résultats obtenus par Sela et ses collaborateurs, semblent le confirmer et on peut penser améliorer du tout au moins égaler ces derniers.

La méthode la plus utilisée pour introduire de nouveaux substituants dans une protéine, consiste à préparer une azoprotéine en couplant un composé diazoïque correspondant au composé chimique étudié sur cette protéine. Ces diazoïques se copulent soit sur des noyaux imidazoles, soit sur les amines libres ou enfin sur les groupements tyrosine d'une protéine comme la sérum albumine bovine, par les réactions suivantes :



De ce fait nous avons préparé dans la première partie de ce travail, différents para-aminobenzoates de thymidine et uridine, le para-nitrobenzoate de cytidine n'ayant pu être réduit. On y trouvera également la préparation de diméthyl-2,6 carboxy-4 benzoate de thymidine et uridine, destinés à être couplés sur les groupements aminés de polypeptides synthétiques par l'intermédiaire de carbodiimides comme indiqué précédemment.

Ces différents para-aminobenzoates et diméthyl-2,6 carboxy-4 benzoates s'étant révélés facilement hydrolysables, nous avons préparé dans la deuxième partie de ce travail les para-nitrophényl éther correspondants de thymidine, uridine et cytidine, très résistants en milieu acide et basique, pour obtenir après réduction, les para-aminophényl éthers correspondants.

Une autre méthode d'obtention de ces nucléosides substitués consiste à faire leur synthèse intégrale, en condensant un dérivé du ribose ou du déoxyribose sur une base purique ou pyrimidique. La troisième partie de ce travail a été consacrée à la synthèse du para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D ribose à partir de glucose ou de déoxy-2 ribose, en vue de condensations ultérieures. Enfin, l'oxydation facile d'une fonction alcool primaire en acide carboxylique nous a amené à préparer l'hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose qui a été finalement condensé sur une purine pour donner l'hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- α et β -adénosine.

- - - - -

Principales abréviations utilisées

c/s : cycles par seconde
D.C.C. : Dicyclohexyl carbodiimide
D.M.F. : Diméthylformamide
D.M.S.O-d₆ : Diméthylsulfoxyde deutérié
nm : nanomètre
M.C. : Mégacycle
ppm : période par million
T.H.F. : Tétrahydrofurane
T.M.S. : Tétraméthylsilane
Tosyl = para-toluènesulfonyl
Δ : chauffage

P r e m i è r e P a r t i e

Para-amino benzoates et diméthyl-2'',6'' téréphtalates de thymidine, uridine, cytidine et adénosine

Chapitre I

Para-aminobenzoyl-O-3' thymidine

Chapitre II

Para-aminobenzoyl-O-5' thymidine

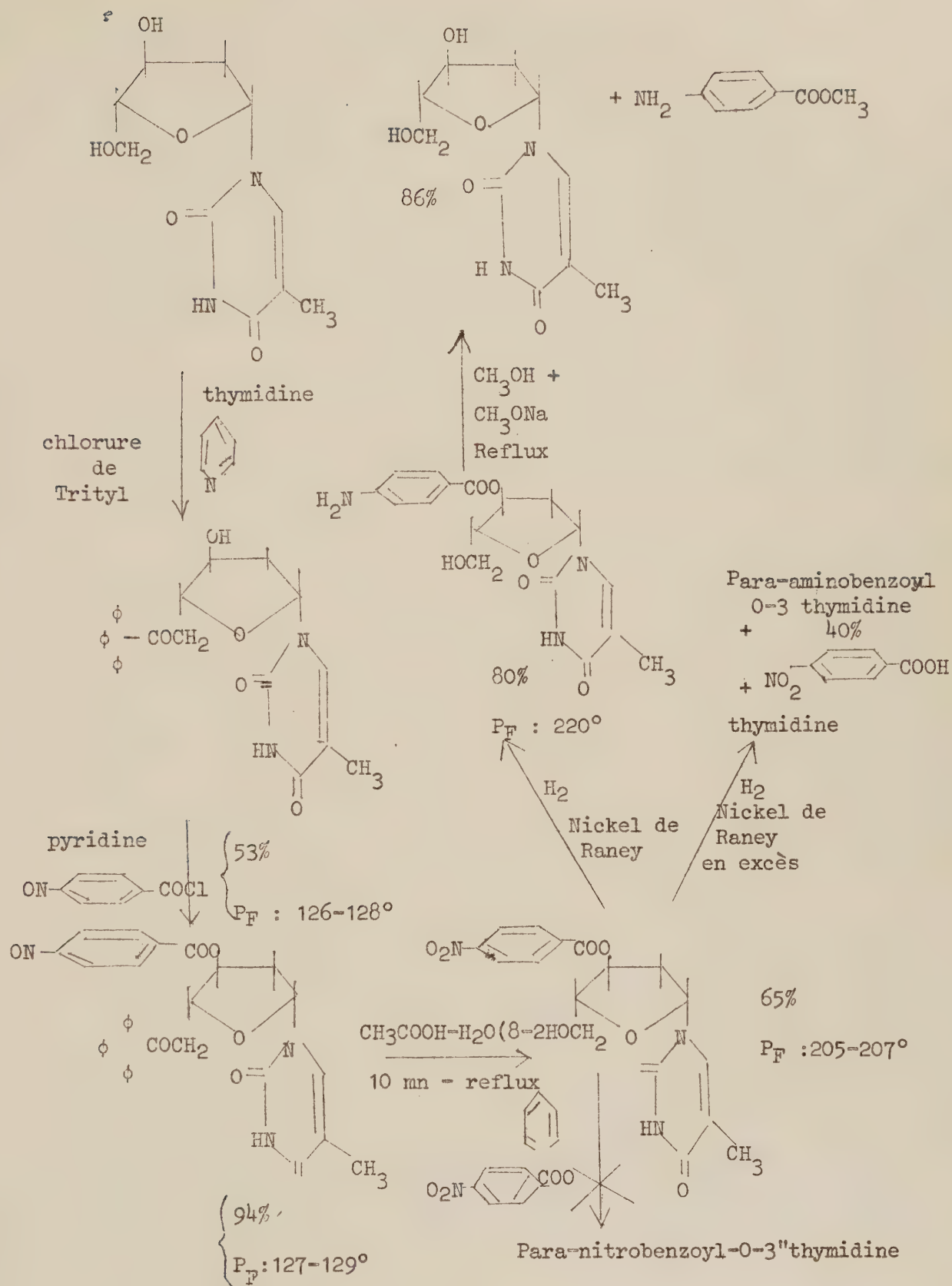
Chapitre III

Diméthyl-2'',6'' carboxy-4'' benzoyl-O-5' thymidine et uridine

Chapitre IV

Remarques sur la réduction d'un para-nitrobenzoate de cytidine.
Action du chlorure de diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoyle sur des dérivés protégés de l'adénosine et de la cytidine. Para-nitrobenzoyl-N-6 isopropylidène-O-2',3' adénosine.

Chapitre I - Schémas réactionnels



C H A P I T R E I

=====

Préparation de la para-aminobenzoyl-O-3' thymidine

En traitant la trityl-O-5' thymidine (7, 8) par le chlorure de para-nitrobenzoyle dans la pyridine, nous avons obtenu la trityl-O-5' para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine (9) avec un rendement presque quantitatif. Cette dernière a été détritylée en para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine par traitement à chaud par l'acide acétique aqueux.

Il convient de signaler que la trityl-O-5' para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine avait déjà été préparée par Fox et Miller (10) en utilisant une méthode différente : l'attaque de la trityl-O-5' cyclo-2,3' thymidine par le para-nitrobenzoate de sodium dans le diméthyl formamide. Nous retrouvons le même point de fusion.

La para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine, dissoute dans un mélange méthanol-isopropanol, a été réduite par l'hydrogène en présence d'une petite quantité de nickel de Raney en para-aminobenzoyl-O-3' thymidine (9) qui a été obtenue à l'état de monohydrate par recristallisation dans l'eau, diazotée et combinée directement à la sérum albumine. Si la quantité de nickel de Raney utilisée comme catalyseur pour cette réduction, est trop importante (soit deux à trois fois le poids du dérivé nitré à réduire), on observe une diminution du rendement en para-aminobenzoyl-O-3' thymidine et l'apparition d'une quantité proportionnelle d'acide para-nitrobenzoïque, si la réduction est arrêtée lorsque le volume théorique d'hydrogène a été absorbé.

Nous avons vérifié que la thymine n'avait pas été modifiée par cette réduction en méthanolysant ce para-aminobenzoate en thymidine et para-aminobenzoate de méthyle qui ont été séparés sur résine acide Dowex 50 (H⁺).

D'une façon générale, en ultraviolet, pour ces composés les chromophores aromatiques et hétérocycliques sont indépendants (J.P. Coat et S.David). Les esters para-nitrobenzoïques ont un maximum à 260 nm ϵ 13.500 qui coïncide pratiquement avec celui de la thymidine en milieu neutre et le spectre ultraviolet de la para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine se présente comme étant la superposition de ces deux derniers spectres : λ max 262nm ϵ = 23.600.

.../...

Par contre, le para-nitrobenzoate de méthyle absorbe beaucoup plus près du visible ($\lambda_{\text{max}} = 287\text{nm}$, $\epsilon = 16.000$) et sur le spectre du para-aminobenzoyl-0-3' thymidine, on voit un épaulement à 275 nm dû à la thymine et un pic à 292 nm dû au groupement para-aminobenzoyl.

En infra-rouge la réduction du groupement nitro en amino est confirmée par la disparition des bandes NO_2 à 1.725 et 1.535 cm^{-1} (NO_2 aromatique) et l'apparition de bandes NH à 3.440 et 3.350 cm^{-1} ainsi qu'une bande C=N aromatique caractéristique à 1.318 cm^{-1} .

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ($\text{DMSO}-d_6$) confirment que les réactions ont bien suivi le cours attendu et que la structure des nucléosides n'a pas été modifiée. Ainsi pour la para-aminobenzoyl-0-3' thymidine, on observe un singulet pour le NH en 3 de la thymine à $\delta = 11,40$ ppm. Les deux protons du groupement amine aromatique donnent un singulet à $\delta = 6,07$ ppm. On observe naturellement le triplet à $\delta = 6,31$ ppm dû au couplage du proton anomère avec les deux protons en 2' du sucre ($J = 7,5$ c/s) (orientation β) et enfin les quatre protons aromatiques donnent deux "doublets" à 6,65 et 7,73 ppm respectivement.

D'autre part, comme nous le signalons dans la partie expérimentale, il ne nous a pas été possible de préparer le di-para-nitrobenzoate 0-5' 0-3' thymidine en traitant la para-nitrobenzoyl-0-3' thymidine par le chlorure de para-nitrobenzoyl dans la pyridine. La réaction a été effectuée à froid et à chaud et dans les deux cas, nous avons récupéré presque quantitativement le produit de départ sans pouvoir isoler le produit attendu. Aucun empêchement stérique ne s'opposant à l'attaque par le chlorure de para-nitrobenzoyl de la fonction alcool primaire en 5', on pourrait supposer que le di-para-nitrobenzoate se forme comme attendu dans le milieu réactionnel. Ceci est d'autant plus plausible que le di-benzoate de thymidine correspondant a été préparé (11) sans difficulté avec un rendement de 85%. Sachant que les para-nitrobenzoates, comme nous le verrons plus loin, s'hydrolysent avec une facilité anormale en milieu légèrement basique, par suite d'une attaque nucléophile intramoléculaire de l'oxygène en position 2 du noyau, on peut supposer que ce di-para-nitrobenzoate, présent dans le milieu réactionnel, disparaît lorsque la solution de pyridine est versée dans l'eau. La basicité de la

.../...

solution aqueuse combinée à l'attaque nucléophile de l'oxygène en 2 pourrait être tenue pour responsable de l'hydrolyse sélective du para-nitrobenzoate en 5', ce dernier étant rendu aisément hydrolysable par la proximité du para-nitrobenzoate en 3'. C'est-à-dire que ce dernier exercerait sur le para-nitrobenzoate en 5' un effet inductif attracteur d'électrons qui activerait davantage le caractère électrophile du carbonyle de la fonction ester et ainsi faciliterait l'hydrolyse. Ceci est une hypothèse. Elle n'a pas été vérifiée en évaporant la pyridine avant toute tentative d'isolation du produit.

o

o

o

../..

P a r t i e E x p é r i m e n t a l e

Trityl-0-5' thymidine

A été préparée selon la méthode de Levene et Tipson (7) en faisant réagir à température ambiante le chlorure de triphenyl méthane sur la thymidine dans la pyridine. Le produit ainsi obtenu a été recristallisé dans le benzène et recristallise avec une molécule de benzène (53%, F $\neq$ 126-128° avec contraction à 116°.

Trityl-0-5' para-nitrobenzoyl-0-3' thymidine

1,686 g de trityl-0-5' thymidine cristallisé avec une molécule de benzène ($3,00 \cdot 10^{-3}$ mole) et 0,556 g de chlorure de para-nitrobenzoyle ($3,00 \cdot 10^{-3}$ mole) sont dissous dans 20 ml de pyridine anhydre. Le mélange réactionnel est ensuite abandonné pendant 3 jours à température ambiante à l'abri de l'humidité, puis versé goutte à goutte dans 200 ml d'eau et de glace magnétiquement agités. Il précipite un solide blanc qui est filtré sur büchner et séché sous vide sur anhydride phosphorique (1,900 g, 100%). F. 103-106°. Ce produit a été recristallisé en dissolvant à chaud dans l'acétonitrile et en ajoutant ensuite de l'eau jusqu'à la limite d'obtention d'un trouble blanc. On obtient ainsi 1,786 g ($2,82 \cdot 10^{-3}$ mole 94%) de cristaux. F. 127-129°.

L'échantillon analytique a été recristallisé une deuxième fois dans les mêmes conditions et fondait à 129-131°.

Analyse $C_{36}H_{31}N_3O_8 \cdot H_2O = 651$

calculé % :	C 66,36	H 5,07	N 6,40
trouvé % :	66,65	5,29	7,30

Spectre infra-rouge (dans le Nujol)

1.725 cm^{-1} (C=O benzoyle) ; 1.700 et 1.665 cm^{-1} (C=O thymine) ;
1.525 et 1.346 cm^{-1} (NO₂) ; 1.260 cm^{-1} (C=O ester) ; 1.055 et 1.090 cm^{-1}
(C-O ether).

Spectre ultra-violet (dans le méthanol) $\lambda_{\max}$ 264 nm ϵ = 24.200 $\lambda_{\min}$ 227 nm ϵ = 8.000Para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine

On chauffe à reflux 2,308 g de trityl-O-5' para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine dans 20 ml d'acide acétique-eau (8 : 2) pendant dix minutes. On évapore à sec en rajoutant plusieurs fois de l'eau. Le solide obtenu est trituré avec de l'éther pour éliminer le triphényl carbinol, et filtré. Cette opération est répétée plusieurs fois. On recristallise dans l'alcool absolu en ajoutant un peu d'eau. On obtient ainsi 0,920 g ($2,35 \cdot 10^{-3}$ mole, 65%) de cristaux. F. 205-207°.

L'échantillon analytique a été recristallisé une deuxième fois et fondait à 207°5.

Analyse ; $C_{17}H_{17}N_3O_8 \cdot H_2O = 409$

calculé % :	C 49,88	H 4,64	N 10,24
trouvé % :	50,18	5,04	9,81

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.510 cm^{-1} (OH) ; 1.730 cm^{-1} (C = O benzoyle) ; 1.700 et 1.680 cm^{-1} (C = O thymine) ; 1.535 cm^{-1} (NO_2) ; 1.280 cm^{-1} (C - O ester) ; 1.100 et 1.070 cm^{-1} (C - O ether).

Spectre ultra-violet (C = $3,8 \cdot 10^{-5}$ M/l dans le méthanol) $\lambda_{\max}$ 210 nm ϵ = 16.500 $\lambda_{\min}$ 228 nm ϵ = 7.400 $\lambda_{\max}$ 262 nm ϵ = 23.600Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 mégacycles, dans DMSO- d_6 , T.M.S. référence interne)4 protons aromatiques : massif centré à δ = 8,28 ppm H_6 singulet δ = 7,78 ppm H_1' triplet δ = 6,35 ppm $J_{1,2'}$ = 7,05 c/s H_3 , massif δ = 5,53 ppm

.../...

OH₅, Triplet $\delta = 5,30$ ppm $J = 4,5$ c/s
 2 H₅, massif $\delta = 4,35$ ppm
 H₄, massif $\delta = 3,78$ ppm $J = 4'5' = 40$ c/s
 CH₃ en 5 singulet $\delta = 1,83$ ppm
 NH en 3 singulet $\delta = 11,38$ ppm

Les deux protons H₂, sont partiellement recouverts par le pic parasite du DMSO.

On note un très fort pic dû à HOD à $\delta = 3,38$ ppm.

Para-aminobenzoyl-O-3' thymidine

On dissout 0,720 g ($1,84 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrobenzoyl-O-3' thymidine dans 100 ml de méthanol et 20 ml d'isopropanol. On ajoute 0,500 g de nickel de Raney (dépôt dans l'alcool) et hydrogène à température et pression ambiantes. Après 6 heures la réaction avait consommé 120 cc d'hydrogène (vol théorique = 123,6 cc). Le nickel de Raney est filtré, lavé à l'alcool. Après évaporation à sec du filtrat et des eaux de lavage, on obtient un solide blanc qui après recristallisation dans un mélange eau-alcool (3=1) donne 0,531 g ($1,47 \cdot 10^{-3}$ mole, 80%) de fines aiguilles blanches. F. 218-219°

L'échantillon analytique a été recristallisé une fois dans l'eau et fondait à 220°

Analyse : C₁₇H₁₉N₃O₆,H₂O = 379

calculé %	C 53,82	H 5,54	N 11,08
trouvé % :	53,78	5,55	11,02
	54,06	5,54	10,74

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.500 cm⁻¹ (OH) ; 3.350 cm⁻¹ (NH amine) ; 3.240 cm⁻¹ (NH thymine) ; 1.710 et 1.680 cm⁻¹ (C = O benzoate et thymine) ; 1.600 cm⁻¹ (NH₂) ; 1.320 cm⁻¹ (C - N amine aromatique) ; 1.100 et 1070 cm⁻¹ (C - O éther).

Spectre ultra-violet (C = $4,9 \cdot 10^{-5}$ mole/l dans le méthanol)

$\lambda_{\max}$ 215 nm $\epsilon = 13.000$
 $\lambda_{\min}$ 238 nm $\epsilon = 3.250$
 $\lambda_{\max}$ 292 nm $\epsilon = 21.600$

.../...

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 MC, DMSO-d₆, TMS réf. int.)

NH en 3 singulet $\delta = 11,40$ ppm

H₆ singulet $\delta = 7,32$ ppm

4 protons aromatiques : deux multiplets à $\delta = 7,73$ ppm (2) et $\delta = 6,65$ ppm (2)

$$J_{2'',3''} = J_{5''6''} = 8,2 \text{ c/s}$$

H_{1'} Triplet $\delta = 6,31$ ppm $J_{1',2'} = 7,5$ c/s

NH₂ aromatique, singulet, $\delta = 6,08$ ppm

OH_{5'} $\delta = 5,33$ ppm

H_{3'} massif non résolu à $\delta = 4,13$ ppm

H_{4'} et 2 H_{5'}, massif non résolu comptant pour 3 protons à $\delta = 3,75$ ppm

2 H_{2'} massif partiellement recouvert par le signal parasite du DMSO-d₆,
 $\delta \approx 2,4$ ppm

CH₃ en 5, singulet, $\delta = 1,82$ ppm.

On note enfin un fort signal parasite dû à $\delta = 3,45$ ppm.

Hydrogénation en présence d'un excès de nickel de Raney

En réduisant comme précédemment 3,824 g ($9,78 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrobenzoyl-O-3'thymidine dans 200 ml de méthanol-isopropanol (4 : 1) en présence de 3,8 g de nickel de Raney (dépôt dans l'alcool) et en arrêtant la réduction lorsque la réaction a consommé 600 ml d'hydrogène (volume théorique 650 ml), on obtient, après filtration du nickel et évaporation à sec, un solide blanc qui n'est pas totalement soluble dans l'eau bouillante. On filtre. La solution aqueuse dépose 1,5 g de para-aminobenzoyl-O-3' thymidine sous forme d'aiguilles qui fondent à 220°. L'insoluble est recristallisé dans un mélange eau-alcool pour donner 0,832 g de cristaux qui fondent à 242° et qui sont de l'acide para-nitrobenzoïque. Le point de fusion est inchangé en mélangeant ces cristaux avec un échantillon authentique d'acide para-nitrobenzoïque.

Méthanolyse de la para-aminobenzoyl-O-3' thymidine

On dissout 0,200 g ($5,3 \cdot 10^{-4}$ mole) de para-aminobenzoyl-O-3' thymidine dans 40 ml de méthanol absolu contenant 40 mg de sodium. La solution est chauffée 1 h 30 à reflux, refroidie et passée sur une colonne de résine Dowex-50(H⁺) préalablement lavée avec du méthanol. Par évaporation de

.../...

l'effluent on obtient de la thymidine (0,112 g = 86%). L'élution de la colonne par de l'acide chlorhydrique dilué donne du para-aminobenzoate de méthyle (0,080 g = F. 113°).

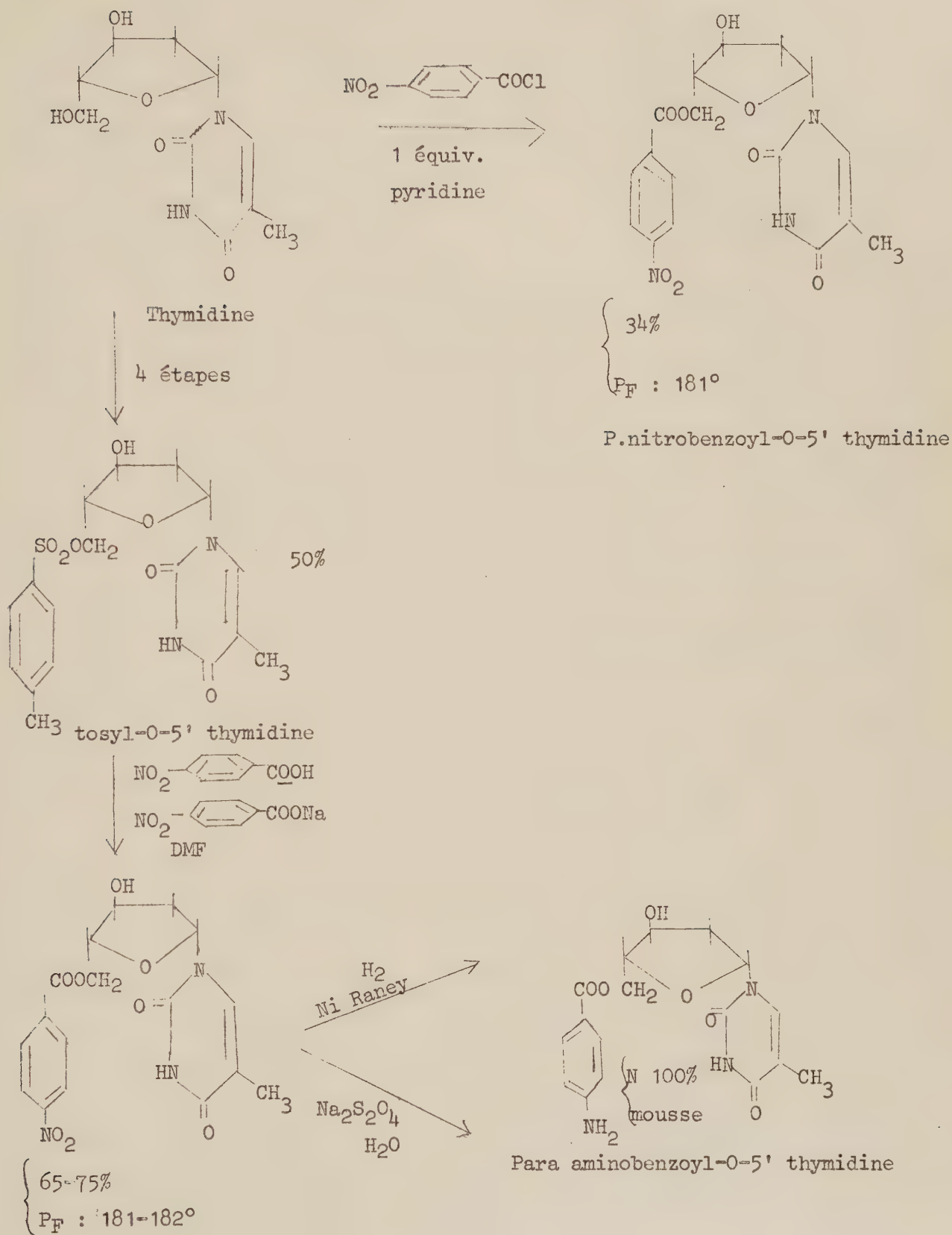
Condensation sur la serum albumine bovine

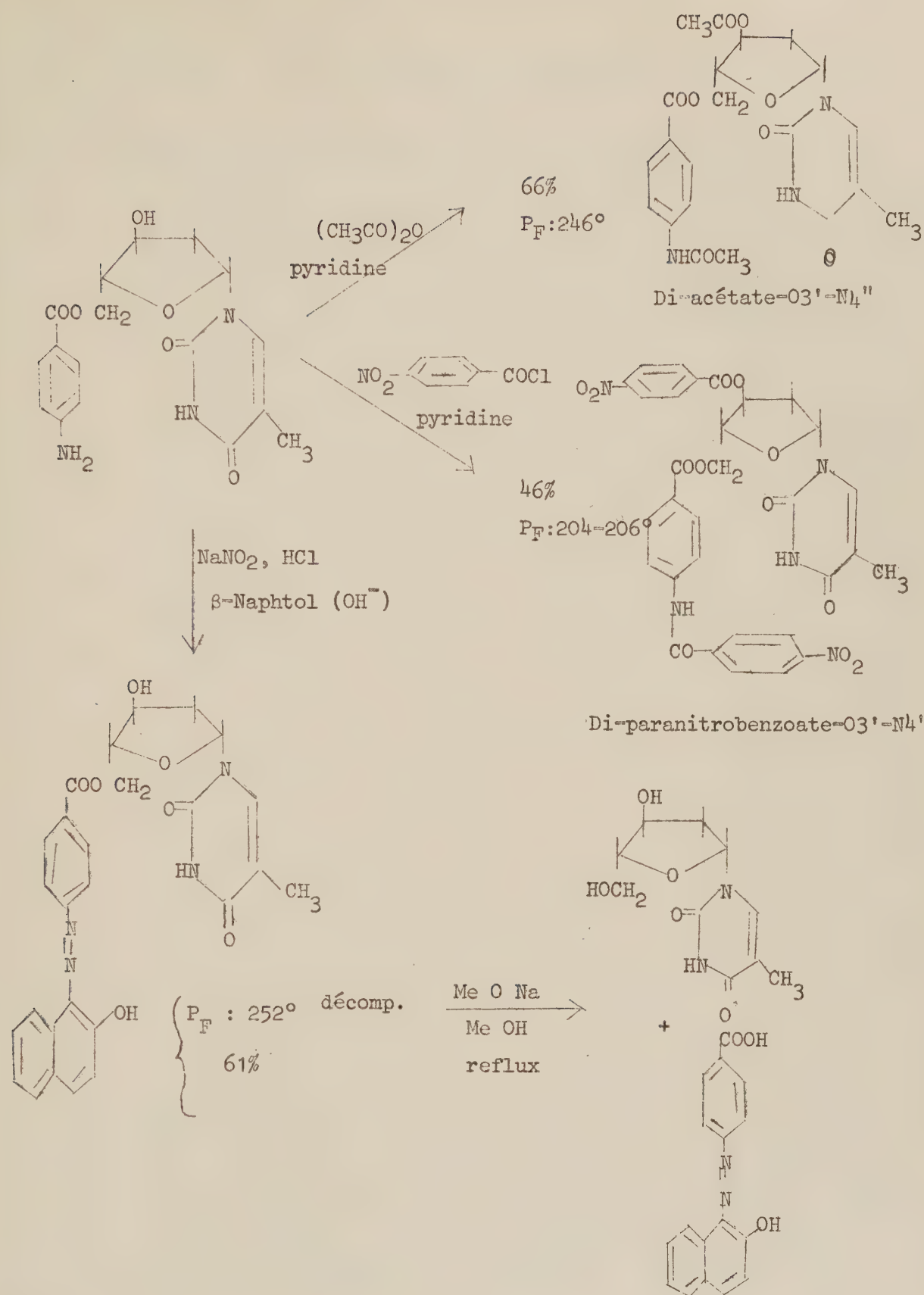
On dissout la para-aminobenzoyl-0-3' thymidine (0,100 g) dans l'eau (120 ml) et le méthanol (60 ml). On refroidit à 0° et ajoute 6 ml de HCl 6N puis 0,138 g ($2 \cdot 10^{-3}$ mole) de nitrite de sodium dans le minimum d'eau. On agite 10 minutes, puis on verse la solution de sel de diazonium dans 250 ml d'eau dans lesquels on a dissout 1 g de sérum albumine et contenant 10 ml de carbonate de sodium 2N. L'addition terminée, on agite 20 minutes et réajuste le pH à 7 par HCl 6N. On sature de sulfate d'ammonium pour précipiter l'azoprotéine de la solution orange. On centrifuge l'azoprotéine et dialyse ensuite contre du sérum physiologique. On emploie directement cette solution pour l'immunisation.

Essai de préparation du di-para-nitrobenzoyl-0-3',5' thymidine

On dissout 0,420 g ($1,08 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrobenzoyl-0-3' thymidine dans 15 ml de pyridine anhydre fraîchement distillée sur potasse et on ajoute 0,201 g ($1,08 \cdot 10^{-3}$ mole) de chlorure de para-nitrobenzoyle. Le mélange réactionnel est chauffé pendant 2 jours à 55° en atmosphère anhydre puis abandonné deux jours à température ambiante. La solution est ensuite versée goutte à goutte dans 200 ml d'eau et de glace magnétiquement agitées et contenant quelque ml d'acide acétique. Le solide blanc ainsi précipité est filtré et séché sous vide (0,400 g. F. 201-203°). Après deux recristallisations dans un mélange eau-alcool, les cristaux obtenus (0,374 g, 87%) fondaient à 205°.

Les données spectrales U.V. et I.R. correspondaient parfaitement à celles d'un échantillon authentique de para-nitrobenzoyl-0-3' thymidine.





C H A P I T R E II

=====

Préparation de la para-aminobenzoyl-0-5' thymidine (12)

Nous avons d'abord pensé préparer la para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine (12) par diacétylation de la para-nitrobenzoyl-0-5' acétyl-0-3' thymidine. Mais la préparation de ce dernier dérivé, par attaque de l'acétyl-0-3' thymidine par le chlorure de para-nitrobenzoyle dans la pyridine, ne nous a pas permis d'isoler le produit attendu.

La para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine a pu être préparée avec un excellent rendement par substitution du groupement tosyl de la tosyl-0-5' thymidine (13) par attaque nucléophile des ions para-nitrobenzoates dans le D.M.F. La réaction a été effectuée à reflux en présence d'un large excès de para-nitrobenzoate de sodium et d'un équivalent d'acide para-nitrobenzoïque. En effet, selon J.J. Fox (14) il est très probable qu'une réaction de ce type passe par l'intermédiaire d'un dérivé anhydro-2,5'. L'acide servirait alors à catalyser la rupture du pont anhydro lors de l'attaque nucléophile des ions benzoates. Toutefois, la substitution en O² modifie considérablement le spectre ultra-violet des nucléosides (15) pyrimidiques et le spectre de notre ester correspond bien à la somme des spectres du para-nitrobenzoate de méthyle et de la thymidine en accord avec la structure du produit. La substitution en position 5' du sucre est également confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire de la para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine qui a été pris à 60 M.C. dans le DMSO-d₆. On note en particulier que l'hydroxyle secondaire en 3' donne un doublet à $\delta = 5,58$ ppm ($\tau = 4,5$ c/s) et que le NH en 3' du noyau thymidine donne un singulet à $\delta = 11,42$ ppm ce qui ne serait pas le cas si la substitution avait lieu sur la base.

La faible solubilité dans l'eau de ce para-nitrobenzoate est cependant suffisante pour en permettre la réduction par l'hydrosulfite de sodium, méthode plus reproductible dans cette série que l'hydrogénation catalytique qui a été cependant également utilisée. La para-aminobenzoyl-0-5' thymidine est une mousse blanche dont le spectre ultra-violet est compatible avec la structure proposée. Elle a été caractérisée par ses diacétate- et dibenzoate-N-4"O-3' cristallisés. Par diazotation et copulation avec le β -naphtol,

../..

on obtient un azoïque également cristallisé qui a été méthanolisé en thymidine.

Comme nous l'avons signalé au chapitre I, il ne nous a pas été possible de préparer la di-para-nitrobenzoyl-O-3',5' thymidine. Nous avons donc tenté la préparation directe de la para-nitrobenzoyl-O-5' thymidine par attaque de la thymidine par le chlorure de para-nitrobenzoyle dans la pyridine. Cette méthode n'a que l'avantage d'être très rapide, (aussi n'avons nous pas utilisé la chromatographie sur colonne pour séparer les produits de la réaction mais la recristallisation plus rapide) et le rendement en para-nitrobenzoyl-O-5'thymidine est faible (environ 30%). Les données spectrales de ce para-nitrobenzoate sont identiques à celles du produit préparé à partir de tosyl-O-5'thymidine et le point de fusion d'un mélange des deux échantillons est resté identique au point de fusion de chacun d'eux (181°).

o

c

o

Partie Expérimentale

Para-toluènesulfonyl-O-5'thymidine

La para-toluènesulfonyl-O-5'thymidine (13) a été préparée en partant de tritylthymidine (14) qui, après acétylation en trityl-O-5' acétyl-O-3'thymidine et détritylation (8), est traitée par le chlorure de para-toluènesulfonyle dans la pyridine. Après déacétylation, on a obtenu la para-toluènesulfonyl-O-5' thymidine avec un rendement global de 45% à 50%, calculé à partir de la trityl-O-5'thymidine.

Para-nitrobenzoyl-O-5'thymidine

On chauffe 10 heures à l'abri de l'humidité un mélange de 1,250 g ($3,16 \cdot 10^{-3}$ mole) de tosyl-O-5'thymidine, 2,390 g (4 équivalents) de para-nitrobenzoate de sodium et de 0,630 g (1 équivalent) d'acide para-nitrobenzoïque dissouts dans 30 ml de diméthylformamide fraîchement distillé sur anhydride phosphorique. Après refroidissement à température ambiante, le mélange réactionnel est versé goutte à goutte dans 800 ml d'une solution aqueuse glacée saturée en bicarbonate de sodium. On ajoute encore 800 ml d'eau et abandonne la solution quelques heures à 0°. On filtre les fines aiguilles de para-nitrobenzoyl-O-5' thymidine (0,800 - 1,000 g - 65 - 75% - F. 166-171°). On recristallise dans l'eau, puis l'alcool. F. 181-182°.

Analyse : $C_{17}H_{17}N_3O_8 = 391,33$

Calculé % : C : 52,17 H : 4,38 N : 10,74

Trouvé % 52,47 4,35 10,44
 52,43 4,43 10,32

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.350 cm^{-1} (OH) ; 3.200 cm^{-1} (NH thymidine) ; 1.720 cm^{-1} (C = O benzoyle)
1.660 et 1.640 cm^{-1} (C = O thymine) ; 1.530 cm^{-1} (NO₂ aromatique) ;
1.095 et 1.055 cm^{-1} (C-O ether) ; 720 cm^{-1} (C-N (NO₂))

Spectre ultra-violet (C == $4 \cdot 10^{-5}$ M/l dans MeOH)

λ_{max} 209 nm $\epsilon = 15.000$

λ_{min} 229 nm $\epsilon = 6.000$, λ_{max} 260 nm $\epsilon = 21.000$

../..

Remarque :

Un autre échantillon analytique recristallisé dans l'alcool puis le benzène fondait de 145 à 155° et avait des spectres U.V. et I.R. identiques.

Trouvé % : C : 52,31 H : 4,43 N : 10,63

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 MC, DMSO-d₆, TMS ref. int.)

NH thymine . en 3 : singulet $\delta = 11,42$ ppm.

4 protons aromatiques ; massif, $\delta = 8,35$ ppm ; $J_{2'3'} = J_{5'6'} = 9,6$ c/s

H₆ : singulet, $\delta = 7,48$ ppm

H_{1'} : triplet, $\delta = 6,27$ ppm, $J_{1'2'} = 6$ c/s

OH_{3'} : doublet, $\delta = 5,58$ ppm, $J = 4,5$ c/s

H_{3'}, 2H_{5'} : massif non résolu, $\delta = 4,6$ ppm

H_{4'} : "pseudo"triplet, $J_{4'5'} = 3,7$ c/s

2H_{2'} : massif $J_{2'1'} = 6$ c/s, $\delta = 2,28$ ppm

CH₃ en 5 : singulet $\delta = 1,71$ ppm

Para-aminobenzoyl-0-5' thymidine

1er procédé : on chauffe une heure à 100°, 1,000 g ($2,58 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrobenzoyl-0-5'thymidine mis en suspension dans 60 ml d'eau contenant 1 g d'hydrosulfite de sodium. La dissolution est pratiquement totale en fin de réaction. On filtre, évapore à sec et sèche le solide jaune résiduel sous vide. Ce dernier est ensuite finement pulvérisé et extrait plusieurs fois avec de la pyridine chaude (3 x 30 ml). Par évaporation de la pyridine on obtient une mousse blanche qui n'a pu être recristallisée (0,915 g - $2,53 \cdot 10^{-3}$ mole = 99%)

Spectre ultra-violet (C = $5 \cdot 10^{-5}$ M/l dans MeOH)

Epaulement à $\lambda = 215$ nm, $\epsilon = 12.000$

$\lambda_{\min}$ 237 nm, $\epsilon = 3.800$, $\lambda_{\max}$ 275 nm, $\epsilon = 16.630$

$\lambda_{\min}$ 286 nm, $\epsilon = 16.200$, $\lambda_{\max}$ 290 nm; $\epsilon = 16.430$

2ème procédé : On dissout 1,000 g de para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine ($2,58 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 50 ml de méthanol. On hydrogène à température et pression ambiante en présence de 0,500 g de nickel de Raney (le nickel a été soigneusement relavé à l'eau avant usage). La réduction est arrêtée lorsque la réaction

.../...

a consommé 175 ml d'hydrogène. Après filtration et évaporation à sec, on obtient une mousse blanche identique à la précédente (0,900 g).

Dérivé caractéristique : diacétate-0-3'-N-4''

On dissout 0,500 g ($1,33 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-aminobenzoyl-0-5' thymidine dans 5 ml de pyridine anhydre et on ajoute 0,408 g ($4 \cdot 10^{-3}$ mole) d'anhydride acétique. On abandonne 24 heures à température ambiante et verse ensuite dans 100ml d'eau glacée magnétiquement agitée. Le fin précipité blanc obtenu est infiltrable et est extrait au chloroforme. La solution chloroformique, après séchage sur sulfate de sodium, est évaporée à sec. On obtient ainsi un solide blanc qui, après deux recristallisations dans le méthanol, fondait à 246° (0,400 g $8,9 \cdot 10^{-4}$ mole; 66%).

Chromatographie - Plaque de gel de silice Prolabo. Solvant : n-butanol-eau (85-15) 1 tache visible en U.V. $R_f = 0,70$

Analyse $C_{21}H_{23}N_3O_8 = 445,42$

Calculé %	C : 56,62	H : 5,20	N : 9,43
Trouvé %	56,14	5,30	9,45

Spectre ultra-violet ($C = 3,5 \cdot 10^{-5}$ M/l dans MeOH)

λ_{max} 211 nm $\epsilon = 18.900$

λ_{min} 232 nm $\epsilon = 4.100$, λ_{max} 269 nm $\epsilon = 29.300$

légère inflexion vers 280 mμ

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

NH amide 3.330 cm^{-1} , NH thymine 3.160 cm^{-1} , C = O acétate 1.745 cm^{-1} , C = O thymine 1.700 et 1.670 cm^{-1} , C = O amide 1.650 cm^{-1} , NH amide 1.600 cm^{-1} , C-O éther 1.070 et 1.025 cm^{-1}

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 MC, DMSO- d_6 , TMS ref. int.)

NH thymine en 3 : singulet $\delta = 11,42 \text{ ppm}$

NH amide aromatique : singulet $\delta = 10,35 \text{ ppm}$

4 protons aromatiques : deux pseudo doublets $\delta = 7,90 \text{ ppm}$ $J_{2''3''} = J_{5''6''} = 9,7 \text{ c/s}$

H₆ thymine : singulet $\delta = 7,46 \text{ ppm}$

H_{1'} : triplet $\delta = 6,26 \text{ ppm}$ $J_{1',2'} = 7,0 \text{ c/s}$

H_{3'}, 2 H_{5'} et H_{4'}, massifs non résolus à $\delta = 5,40$, $4,53$ et $4,37 \text{ ppm}$ respectivement.

2 H'₂ signal partiellement recouvert par le signal parasite de DMSO, $\delta = 2,44 \text{ ppm}$

2 CH₃ acétyl : singulet $\delta = 2,10 \text{ ppm}$

CH₃ thymidine : singulet $\delta = 1,65 \text{ ppm}$

Dérivé caractéristique : Di-para-nitrobenzoate-03'-N₄"

0,470 g ($1,30 \cdot 10^{-3}$ mole) du para-aminobenzoate précédent et 0,557 g de chlorure de para-nitrobenzoyle sont dissouts dans 5 ml de pyridine anhydre. On abandonne 24 heures à température ambiante, puis cette solution est versée goutte à goutte dans 100 ml d'eau glacée agitée. La gomme ainsi précipitée est abandonnée quelques jours à 0°, puis décantée du liquide surnageant et dissoute dans un peu d'acétone. On ajoute du méthanol et évapore l'acétone sur bain-marie. La solution dépose après refroidissement à 0°, 0,510 g de cristaux ($P_F = 155-165^\circ$) et qui présentent trois taches dans le système de chromatographie précédent. En recristallisant une deuxième fois dans les mêmes conditions on obtient 0,400 g de cristaux ($0,60 \cdot 10^{-4}$ mole, 46%) F. 204-206°

Analyse $C_{31}H_{25}N_5O_{12} = 659$

Calculé %	C : 56,44	H : 3,79	N : 10,62
Trouvé %	56,18	4,03	10,66
	56,10	3,98	10,68

Spectre ultra-violet ($C = 3 \cdot 10^{-5}$ M/l dans MeOH)

$\lambda_{\min}$ 228 nm $\epsilon = 16.000$, $\lambda_{\max}$ 260 nm $\epsilon = 41.000$
Inflexion vers 290 nm $\epsilon = 24.000$

Copulation avec le β -naphtol

On dissout 0,7 g ($1,9 \cdot 10^{-3}$ mole) de l'amine ci-dessus dans 20 ml d'alcool, refroidi à 0° et ajoute 5,7 ml d'acide chlorhydrique N, puis goutte à goutte, 0,138 g de nitrite de sodium dissout dans 10 ml d'eau glacée, en 45 minutes avec agitation. La solution de diazoïque est versée goutte à goutte dans une solution agitée de 0,280 g de β -naphtol dans 6 ml de soude N, en 20 minutes à 0°. On poursuit l'agitation une heure, puis on ramène le pH à 4-3 par l'acide chlorhydrique dilué. Le précipité rouge est filtré, lavé à l'eau, séché (1,00 g. $1,16 \cdot 10^{-3}$ mole . 61%) F. 243-244°. L'échantillon analytique a été recristallisé une deuxième fois dans l'acétonitrile. F 252° décomp.

Analyse $C_{27}H_{24}O_7N_4 = 516,49$

Calculé %	C : 62,78	H : 4,68	N : 10,85
trouvé %	61,91	4,78	10,90
	61,94	4,68	10,85
		4,71	

.../...

Spectre ultra-violet ($C = 3,5 \cdot 10^{-5}$ M/l dans le méthanol)

$\lambda_{\max}$ 225 nm $\epsilon = 40.000$, $\lambda_{\min}$ 243 nm $\epsilon = 15.700$, $\lambda_{\max}$ 263 nm $\epsilon = 20.300$,
épaulement autour de 268 nm, $\lambda_{\min}$ 290 nm $\epsilon = 10.600$, épaulement à 302 nm
 $\epsilon = 13.550$, $\lambda_{\max}$ 311 nm $\epsilon = 14.400$, $\lambda_{\min}$ 342 nm $\epsilon = 2.600$, $\lambda_{\max}$ 475 nm
 $\epsilon = 23.000$.

Alcoolyse :

On chauffe 4 heures à reflux 0,210 g ($4 \cdot 10^{-3}$ mole) de l'azoïque ci-dessus dans 50 ml de méthanol contenant une millimole de méthylate de sodium. On évapore à sec, redissout dans l'eau (50 ml) et acidifie par l'acide acétique (3 ml). On sépare par filtration le précipité rouge d'acide azobenzoïque (0,120 g). On fait passer le filtrat sur une colonne Dowex-50 (H^+). Par évaporation à sec on obtient 85 mg d'un produit blanc chromatographiquement identique à la thymidine.

Para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine : synthèse directe.

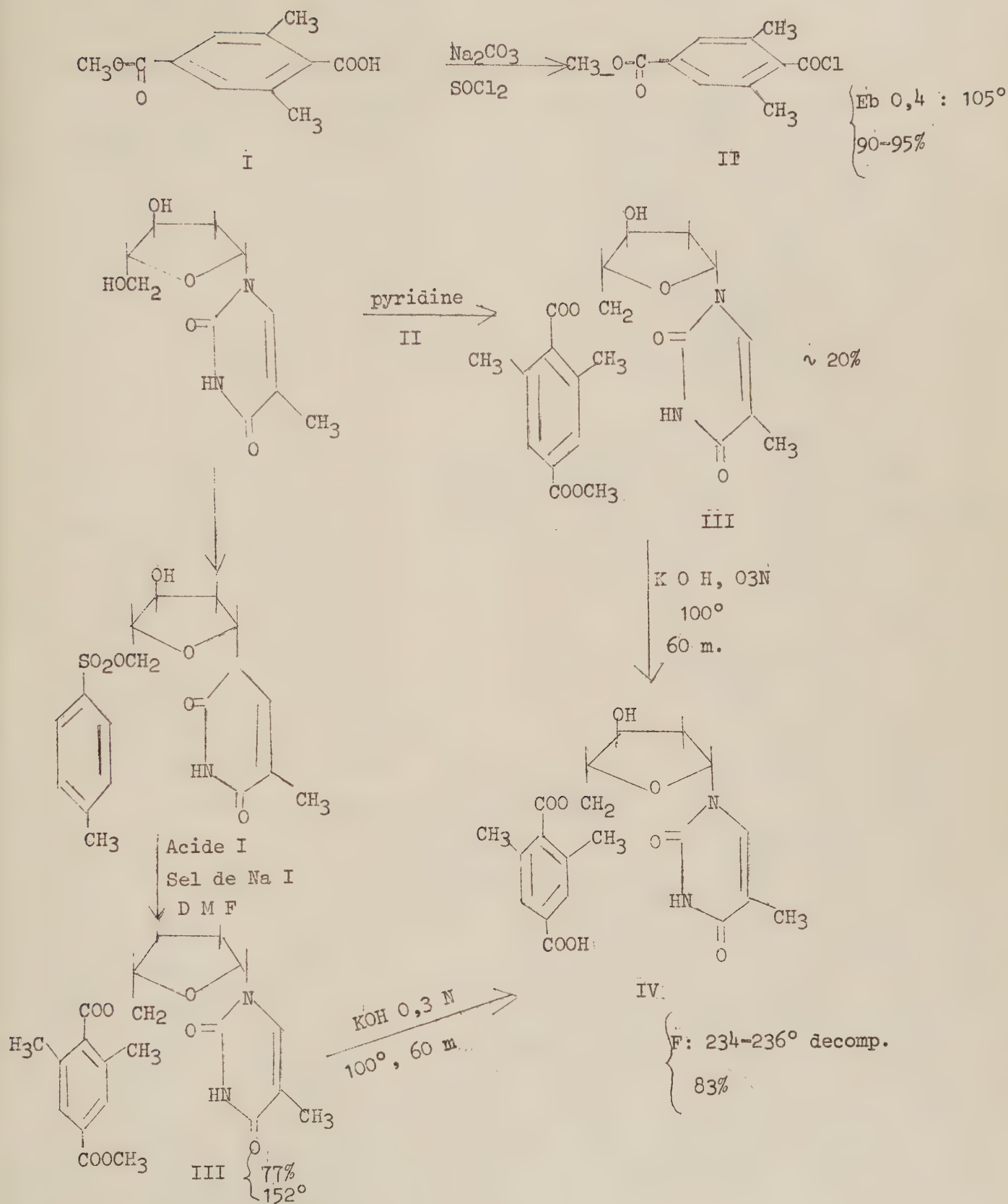
On dissout, en chauffant un peu, 1,000 g de thymidine ($4,12 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 12 ml de pyridine anhydre. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute 0,764 g de chlorure de para-nitrobenzoyle ($4,12 \cdot 10^{-3}$ mole) et abandonne cette solution pendant 6 jours à température ambiante et en atmosphère anhydre. La solution, devenue jaune, est ensuite versée goutte à goutte dans 200 ml d'eau glacée agitée magnétiquement. Il précipite un épais solide jaunâtre fin^{qui}vest filtré et séché sous vide (0,830 g).

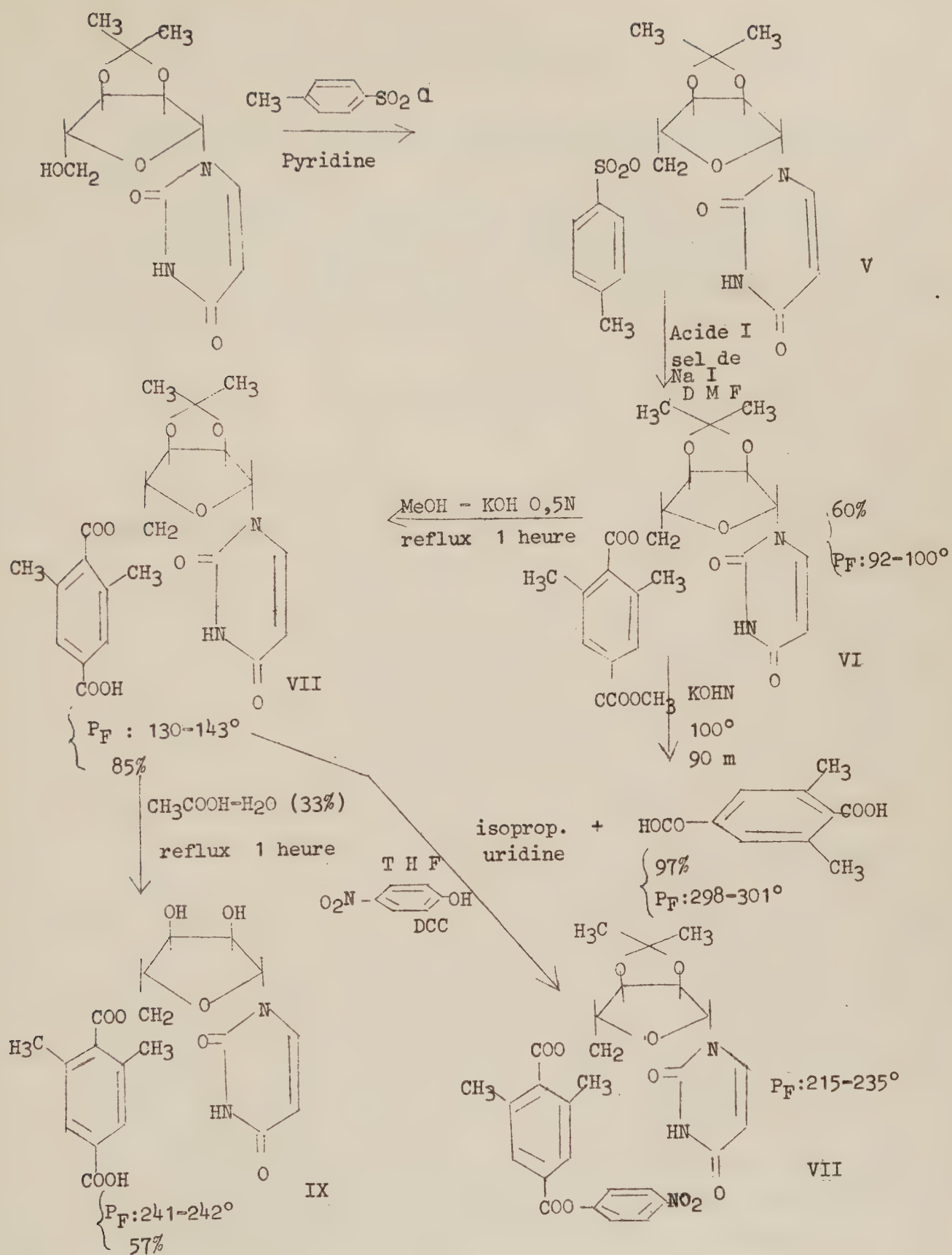
Le filtrat est extrait plusieurs fois avec du chloroforme. La solution chloroformique est lavée avec de l'acide sulfurique 0,2 N jusqu'à un pH voisin de 3. Il précipite alors un solide blanc fin^{qui}vest filtré, séché sous vide (0,251 g) et qui est de la para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine pure. F. 180-181°. En recristallisant plusieurs fois dans l'eau puis l'alcool le solide précipité dans l'eau, on obtient 0,300 g de para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine. F. 181°. Poids total obtenu : 0,551 g ($1,4 \cdot 10^{-3}$ mole. 34%).

Les spectres U.V. et I.R. de ce produit se sont révélés identiques à ceux obtenus précédemment.

- - - - -

Chapitre III - Schémas réactionnels



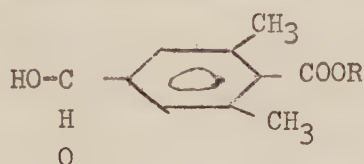


C H A P I T R E I I I

=====

Préparation de la diméthyl-2",6" carboxy-4" benzoyl-0-5' thymidine et uridine (12)

Etant donné la grande facilité avec laquelle les para-nitro et para-aminobenzoates de thymidine et d'uridine s'hydrolysent en milieu basique, nous avons voulu mettre à profit une propriété bien connue des esters en 1 de l'acide diméthyl-2,6 téréphtalique : leur très grande résistance à l'hydro-



lyse en milieu alcalin. Aussi avons-nous synthétisé les diméthyl-2,6 téréphtalates de l'uridine et de la thymidine en 5'.

La diméthyl-2",6" carbomethoxy-4" benzoyl-0-5' thymidine III et le dérivé correspondant de l'isopropylidène uridine VI ont été obtenus par attaque nucléophile dans la DMF de la tosyl-0-5' thymidine et du tosylate d'uridine V (16) par le sel de sodium de l'acide diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoïque I (17). Ici encore, nous avons opéré en présence d'un excès de sel de sodium et d'un équivalent d'acide pour le cas où la réaction se ferait par l'intermédiaire d'un anhydro-2,5' (14). Dans les deux cas la réaction a un rendement voisin de 70% en produit recristallisé.

Dans le cas de la thymidine, la diester III a pu être préparé en une seule étape, avec cependant un rendement faible (20%), en attaquant la thymidine par le chlorure d'acide II dans la pyridine. Ce composé s'est révélé être identique à celui obtenu par la méthode précédente. Nous n'avons pas isolé d'ester en 03' dans cette réaction. On peut imaginer que l'encombrement stérique du réactif II est voisin de celui du chlorure de trityle, et qu'il présente également une certaine sélectivité vis-à-vis des fonctions alcools. Messieurs Khorana et ses collaborateurs rapportent un comportement analogue du chlorure de mésitoyle (18).

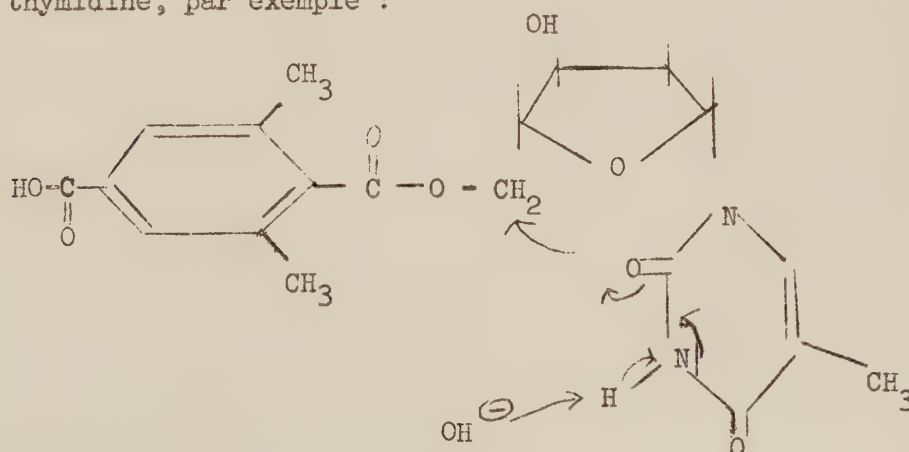
Dans tous les cas, nous avons vérifié que la substitution avait bien eu lieu sur le sucre et non sur le noyau. Ici encore les spectres U.V. correspondent à la superposition des spectres U.V. des nucléosides et de celui de

l'acide ou de son ester. Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été pris dans le DMSO- d_6 et confirment l'existence du proton sur l'azote en 3 de la thymine et de l'uracile par la présence d'un signal autour de $\delta = 11,40$ ppm.

L'éther méthylique en 4'' a été hydrolysé par la potasse 0,3-0,4 N avec un rendement presque quantitatif pour donner les acides IV et IX de la thymidine et de l'uridine respectivement. Si la normalité de la solution de potasse est supérieure à 0,5 N on note une hydrolyse de la fonction ester en 5' du nucléoside.

Ceci a été vérifié en traitant 0,357 g ($0,853 \cdot 10^{-3}$ mole) de diméthyl-2'',6'' carboxy-4'' benzoyl-0-5' thymidine par 4 ml de soude 1,000 N à température ambiante (25°) et endosant la quantité de soude consommée par l'acide sulfurique à des intervalles de temps déterminés. On constate ainsi, qu'à cette température la vitesse d'hydrolyse est assez lente mais appréciable malgré tout. Le pourcentage de produit hydrolysé était de 40% après 2 h 30 pour atteindre 76% environ après 100 heures. Or, les esters en position 1 de l'acide diméthyl-2,6 téréphtalique sont connus comme étant très résistants à l'hydrolyse alcaline par suite de l'encombrement stérique dû aux deux groupements méthyle 2 et 6 (17). Nous l'avons vérifié en chauffant à reflux le diméthyl-2,6 carboxy-4 benzoate de méthyle dans la soude N. après 5 heures de reflux, le pourcentage d'ester hydrolysé était nul.

Ces résultats ne peuvent donc s'interpréter qu'en admettant une participation de l'oxygène en position 2 de l'hétérocycle à l'hydrolyse de la fonction ester en 5' du sucre. Ce qui peut être schématisé comme suit pour la thymidine, par exemple :



Il est probable qu'il se forme de l'anhydro-0-2,5' thymidine et le sel de sodium de l'acide.

Il convient cependant de noter que les diméthyl téréphtalates sont beaucoup plus résistants à l'hydrolyse en milieu basique que les para-nitrobenzoates-0-3' ou 5' de la thymidine et de l'uridine, puisque la vitesse d'hydrolyse des téréphtalates est uniquement déterminée par l'attaque nucléophile de l'oxygène en 2 sur le carbonyle en 5' et non par l'attaque des dihydroxyyles qui sont stériquement gênés par les deux méthyles 2" et 6". Ainsi nous avons constaté dans un autre essai que la para-nitrobenzoyl-0-3' thymidine traitée par la soude N à température ambiante était totalement hydrolysée en un temps inférieur à 30 minutes.

Enfin, le téréphtalate acide VII de l'uridine est débloquent dans l'acide acétique à 33% à 100° pour donner la diméthyl-2",6" carboxy-4" benzoyl-0-5' uridine IX. Il a été converti en ester actif VIII par estérification par le Para-nitrophénol en présence de dicyclohexylcarbodiimide dans le tétrahydrofurane. Ce dérivé est facilement obtenu pur cristallisé, mais son utilisation semble difficile en raison de sa faible solubilité.

o

o

o

Partie Expérimentale

Purification de l'acide diméthyl-2,6 téréphtalique

L'acide diméthyl-2,6 téréphtalique obtenu selon M. Cachia et H. Wahl (17) était très impur et a pu être purifié comme suit.

On dissout 25 g de l'acide recristallisé une fois dans le méthanol aqueux (1 : 1) dans 150 ml du même solvant et neutralise par de la soude 2N (pH final : 7,5). Par évaporation à sec, on obtient une gomme brune qui est reprise dans 100 ml d'eau et chauffée 30 mn au bain-marie avec 10 g de charbon actif. On refroidit et fait passer la solution filtrée sur une colonne de 50 g de Dowex-2, X8, 100-200 mesh mise sous forme formiate. On élue par NaOH 2N. L'acide qui précipite par acidification du filtrat par HCl est ensuite converti en acide diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoïque I (17) dont le sel de sodium, poudre blanche, est desséché sous vide.

Chlorure de diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoyle II

On mélange 16,5 g d'acide diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoïque (7,9. 10^{-2} mole) avec un poids égal de Na_2CO_3 anhydre. On ajoute 60 ml de SOCl_2 et chauffe 2 heures à reflux. On élimine SOCl_2 par évaporations répétées avec du benzène anhydre. On reprend par du benzène, filtre, évapore à sec et distille le résidu. Eb 0,4 105°. L'huile jaune obtenue (20 g) cristallise au bout de quelques jours. F : 40-42°.

Diméthyl-2",6" carboxy-4" benzoyl-0-5'thymidine IV

1er procédé : A une solution de 1,000 g ($4,12 \cdot 10^{-3}$ mole) de thymidine dans 15 ml de pyridine anhydre, on ajoute 0,933 g ($4,12 \cdot 10^{-3}$ mole) de chlorure d'acide II. On agite jusqu'à dissolution complète et abandonne 4 jours à température ambiante la solution rouge foncé. On verse goutte à goutte dans 250 ml d'eau glacée et extrait, après quelques heures, au chloroforme (4 x 80 ml) la gomme rougeâtre ainsi précipitée et évapore à sec. On chromatographie le résidu (1,242 g) dissout dans CH_2Cl_2 sur 50 g de gel de silice. Le chlorure de méthylène et le chloroforme éluent des fractions amorphes non nucléosidiques. Les fractions éluées ensuite par CHCl_3 pur et par le mélange CHCl_3 -EtOH (90-10) sont réunies. On obtient 0,950 g d'un solide blanc. F. 161-163° après contraction à 128°. On hydrolyse ce solide par chauffage à reflux 40 mn dans 24 ml

de potasse méthanolique 0,4 N. On ajoute 50 ml d'eau et évapore l'alcool, refroidi à 0° et acidifié par HCl dilué (pH final 1). La gomme qui précipite se solidifie par trituration et on la filtre après quelques heures à 0° (0,500 g). F. 211-216°, montant à 222-226 par recristallisation dans l'eau et l'alcool. Le point de fusion d'un mélange avec la diméthyl-2"6" carboxy-4" benzoyl-0-5' thymidine authentique est 223-228°. Par chromatographie sur couche mince (gel de silice Prolabo), en utilisant le mélange n-butanol-eau (85+15) comme phase mobile, on observe une tache ($R_f = 0,28$) fluorescente, située au même niveau qu'un témoin de thymidine estérifiée authentique et une tache non fluorescente ($R_f = 0,44$) située au même niveau qu'un témoin d'acide diméthyl-2,6 téréphtalique. Une séparation sur couche épaisse du mélange (45 mg) a donné 30 mg de thymidine estérifiée et 16 mg d'acide diméthyltéréphtalique, identifiés par leurs spectres ultra-violet. Il y a donc 65% d'est. en 0-5' dans le mélange, soit un rendement global de 20%.

Par recristallisation dans le méthanol aqueux (1 = 1), on obtient, après plusieurs jours à 0°, la diméthyl-2"6" carboxy-4" benzoyl-0-5' thymidine, homogène sur couche mince, F. 227-230° seule ou mélangée à un échantillon authentique.

Diméthyl-2"6" carbomethoxy-4" benzoyl-0-5' thymidine : III

On chauffe 10 heures à reflux à l'abri de l'humidité une solution de 1,732 g ($4,37 \cdot 10^{-3}$ mole) de tosyl-0-5' thymidine avec quatre équivalents (4,020g) de diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoate de sodium et un équivalent d'acide correspondant (0,950 g) dans 80 ml de diméthylformamide anhydre (distillée sur P_2O_5). On ajoute 30 ml d'eau, évapore à sec et reprend le résidu par 150 ml d'eau. La suspension est ensuite extraite au chloroforme (3 x 100 ml). La couche organique est lavée par une solution saturée de $NaHCO_3$ (2 x 100 ml), à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. Le résidu cristallise par trituration dans le benzène. On le recristallise par dissolution dans 600 ml de benzène bouillant et concentration à mi-volume (1,455 g soit $2,36 \cdot 10^{-3}$ mole ; 77% ; F. 150-151°). L'échantillon analytique a été recristallisé une fois supplémentaire dans le benzène et l'alcool. F. 152°.

Analyse : $C_{21}H_{24}O_8N_2 = 432$

Calculé % : C : 58,33

H : 5,59

N : 6,48

Trouvé % 58,19

5,85

6,47

Spectre infra-rouge (dans le chloroforme)

3.485 cm^{-1} (OH) ; 3.200 cm^{-1} (NH thymine) ; 2.930 cm^{-1} (C=CH₃) ; 1.720 et 1.710 cm^{-1} (C=O ester) ; 1.700 et 1.690 cm^{-1} (C=O thymine) ; 1.470 et 1.435 cm^{-1} (C-CH₃) ; 1.075 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre ultra-violet (C = 4. 10⁻⁵ M/l dans MeOH)

λ_{max} 207 nm ϵ = 34.700, λ_{min} 224 m ϵ = 10.500

λ_{max} 243 nm ϵ = 15.000

Epaulement à 260 nm ϵ = 12.200.

Diméthyl-2'',6'' carboxy-4'' benzoyl-0-5' thymidine : IV

On maintient 60 minutes au bain-marie bouillant une solution de l'ester précédent (1,000 g - 2,3.10⁻³ mole) dans 25 ml de potasse 0,3N. On ajoute de l'eau (20 ml), refroidi à 0° et acidifie (pH = 2) par HCl dilué. La gomme blanche précipitée se solidifie après une journée au réfrigérateur. On filtre le solide (F. 216-224°) et on le recristallise dans l'eau. Aiguilles (0,800 g 1,9.10⁻³ mole - 83%).

Analyse C₂₀H₂₂N₂O₈ = 1.8,59

Calculé %	C : 57,41	H : 5,30	N : 6,70
-----------	-----------	----------	----------

Trouvé %	57,28	5,40	6,41
----------	-------	------	------

Spectre ultra-violet (C = 6,5.10⁻⁵ M/l dans MeOH)

λ_{min} 229 nm ϵ = 10.900 ; λ_{max} 240 nm ϵ = 12.500 ;

Epaulement à 260 nm ϵ = 10.700

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 M.C., DMSO-d₆, TMS réf. int.)

NH en 3, singulet δ = 11,35 ppm

2 protons aromatiques (3'' et 5'') singulet, δ = 7,68 ppm

H₆ singulet δ = 7,40 ppm

H_{1'} triplet, δ = 6,25 ppm, $J_{1,2'}$ = 6,3 c/s

OH_{3'} et 2 H_{5'}, massif non résolu, δ = 4,57 ppm

H_{3'} et H_{4'}, 2 massifs à δ = 4,35 et 4,10 ppm respectivement

2 CH₃ aromatiques, singulet, δ = 2,31 ppm

CH₃ en 5, singulet, δ = 1,65 ppm

2 H_{2'}, massif recouvert par le signal des deux méthyles en 2'' et 6''. Autour de 2,2 ppm.

Le proton du carboxyle n'a pas donné de signal;

Le même spectre pris dans le DMSO-d₆ avec de l'eau lourde est tout à fait comparable. Cependant, le signal du proton échangeable en 3 sur l'azote a disparu et le massif à $\delta = 4,57$ ppm comptant précédemment pour 3 protons (2 H₅, et OH₃,) est modifié et donne une intégration correspondant à 2 protons (2 H₅,).

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.400 cm⁻¹ forte bande (OH) ; 3.180 cm⁻¹ (NH thymine) ; 1.730 cm⁻¹ (C=O ester) ; 1.690 et 1.670 cm⁻¹ (C=O thymine) ; 1.650 cm⁻¹ (C=O carboxyle) 1.060 et 1.020 cm⁻¹ (C-O éther).

Hydrolyse :

Après chauffage à reflux pendant 1 h 30 mn de 1,000 g de diméthyl-2'',6'' carboxy-4'' benzoyl-O-5' thymidine dans 25 ml de potasse normale, on recueille après dilution à l'eau et acidification (pH = 1) 0,360 g (97%) d'acide diméthyl-2,6 téréphtalique pur. F. 298-301°. Le point de fusion est inchangé en mélangeant cet acide avec un échantillon authentique d'acide diméthyl-téréphtalique.

Diméthyl-2'',6'' carbométhoxy-4'' benzoyl-O-5' isopropylidène-O-2',3' uridine VI

On chauffe 12 heures à 110° à l'abri de l'humidité, une solution de 3,100 g (7.10⁻³ mole) de tosyl-O-5' isopropylidène-O-2'3' uridine V avec un équivalent (1,468 g) d'acide diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoïque I et quatre équivalents (6,50 g) du sel de sodium de cet acide dans 100 ml de diméthylformamide. On verse, après refroidissement, sur 1 litre d'eau et de glace agitée et extrait au chloroforme (4 x 100 ml). On lave la couche organique avec une solution aqueuse glacée de NaHCO₃ (2 x 100 ml), à l'eau (2 x 100 ml), sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec. En reprenant le résidu dans le benzène bouillant, on obtient, après addition d'heptane, de très beaux cristaux. F. 92-100° (3,154 g - 60%).

Analyse : C₂₃H₂₆N₂O₉, 1/2 C₆H₆ = 513,17

Calculé % :	C : 60,84	H : 5,65	N : 5,46
Trouvé % :	61,37	5,73	5,26

Spectre infra-rouge (dans le chloroforme)

3.190 cm⁻¹ (NH uracile) ; 3.020 - 2.990 cm⁻¹ et 2.970 cm⁻¹ (C(CH₃)₂ et C-CH₃ aromatique) ; 1.720 cm⁻¹ (C=O ester) ; 1.690 cm⁻¹ (C=O uracile) ; 1.455 et 1.440 cm⁻¹ (C-CH₃) ; 1.380 cm⁻¹ (C(CH₃)₂ (doublet ; 1.260 et 1.230 cm⁻¹ (C-O ester) ; 1.080 cm⁻¹ (C-O éther) .

Spectre ultra-violet ($C = 4,5 \cdot 10^{-5}$ M/l dans MeOH)

$\lambda_{\min}$ 223 nm $\epsilon = 8.820$, $\lambda_{\max}$ 245 nm $\epsilon = 16.900$

λ 260 nm = 11.760

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 M.C., DMSO- d_6 ; T.M.S. réf.int.)

NH en 3 : singulet, $\delta = 11,49$ ppm

H₆ , $\delta \approx 7,78$ ppm, partiellement recouvert par les deux protons aromatiques

2 protons aromatiques : singulet, $\delta = 7,68$ ppm

H₁' : $\delta = 5,85$ ppm

H₅ : doublet, $\delta = 5,60$ ppm, $J_{5-6} = 8,2$ c/s

H₃' et H₄' deux massifs à $\delta = 5,18$ et $4,88$ ppm

2 H₅' et H₂' massif non résolu, $\delta = 4,5^h$ ppm

- OCH₃ ester : singulet $\delta = 3,88$ ppm

2 CH₃ aromatiques : singulet $\delta = 2,30$ ppm

- 2 CH₃ isopropylidène : deux singulets à $\delta = 1,50$ et $1,32$ ppm

On note un signal à $7,36$ ppm, qui a été attribué au benzène de cristallisation. L'intégration de ce pic ("singulet") correspond à deux ou trois protons, donc sensiblement à un demi-molécule de benzène par molécule d'uridine cristallisée.

Diméthyl-2'',6'' carboxy-4'' isopropylidène-0-2',3' benzoyl-0-5' uridine VII

On chauffe une heure à reflux $4,982$ g ($9,7 \cdot 10^{-3}$ mole) de l'ester ci-dessus dans 60 ml de potasse méthanolique $0,4$ N. On refroidi à 0° et ramène le pH à 4^{avec} de l'acide acétique. On recueille un précipité blanc (4.000 g $8,3 \cdot 10^{-3}$ mole = 85%), recristallisable avec difficulté dans l'eau. F. $130-143^\circ$

Analyse : $C_{22}H_{24}N_2O_9, H_{20} = 478,43$

Calculé % : C : 55,18

H : 5,43

N : 5,85

Trouvé % : 55,53

5,32

5,84

Spectre ultra-violet ($C = 6,5 \cdot 10^{-5}$ dans MeOH)

$\lambda_{\max}$ 210 nm $\epsilon = 19.500$, $\lambda_{\min}$ 226 nm $\epsilon = 8.700$

$\lambda_{\max}$ 244 nm $\epsilon = 14.500$

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.500 cm⁻¹ large bande (hydroxyle) ; 3.180 cm⁻¹ (NH uracile) ; 1.720 cm⁻¹ (C = O ester) ; $1.715 - 1.680$ (bandes C = O) ; 1.270 et 1215 cm⁻¹ (C - O ester) ; 1.075 cm⁻¹ (C-O ether).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 MC, DMSO- d_6 , TMS réf. int.)

NH en 3 : singulet, $\delta = 11,48$ ppm

H₆ particulièrement recouvert par les deux protons aromatiques, $\delta \approx 7,79$ ppm

2 protons aromatiques, singulet, $\delta = 7,67$ ppm

H_1' : $\delta = 5,35$ ppm

H_3' : doublet de doublet, $\delta = 5,18$ ppm, $J_{3,2'} = 6$ c/s, $J_{3,4'} = 1,6$ c/s

H_4' : triplet dégénéré, $\delta = 5,40$ ppm $J_{4,5'} = 4,8$ c/s

2 H_5' et H_2' , massif, $\delta = 4,55$ ppm

2 CH_3 aromatiques, singulet, $\delta = 2,30$ ppm

2 CH_3 isopropylidène, deux singulets à $\delta = 1,52$ et $1,33$ ppm

Dérivé caractéristique : Para-nitrophenyl ester VIII

On dissout 0,267 g de l'acide ci-dessus ($0,58 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 10 ml de tétrahydrofurane avec l'aide de quelques mg de pyridine anhydre. On ajoute 97 mg ($0,7 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrophenol, refroidi à 0° et ajoute 146 mg ($0,58 \cdot 10^{-3}$ mole) de dicyclohexylcarbodiimide et on laisse reposer 24 heures à 0° . On filtre la dicyclohexylurée précipitée, lave le précipité au tétrahydrofurane et évapore le filtrat à sec. On recristallise dans l'acétonitrile. F. $215-235^\circ$.

Analyse : $C_{28}H_{27}N_3O_{11} = 581,52$

Calculé % :	C : 57,82	H : 4,64	N : 7,22
Trouvé % :	57,43	4,85	7,11

Chromatographie : Plaque de gel de silice fluorescent Prolabo. Phase mobile: n-butanol-eau (85 :: 15). Une seule tache $R_F = 0,83$

Diméthyl-2'',6'' carboxy-4'' benzoyl-0-5' uridine IX

On chauffe une heure à 100° 2,5 g ($5,2 \cdot 10^{-3}$ mole) d'isopropylidène cétal dans 100 ml d'acide acétique à 33%. On laisse refroidir, ajoute de l'eau et évapore à sec (ceci est répété 3 fois). On recristallise le résidu dans l'eau et l'acétonitrile (90 : 10). On recueille ainsi 1,320 g de cristaux ($3 \cdot 10^{-3}$ mole - 57%). F. $241-242^\circ$.

Analyse : $C_{20}H_{20}O_9N_2 \cdot 1/2 H_2O = 441$

Calculé % :	C : 54,28	H : 4,75	N : 6,34
Trouvé % :	54,46	4,52	6,14
	54,52	4,35	6,15

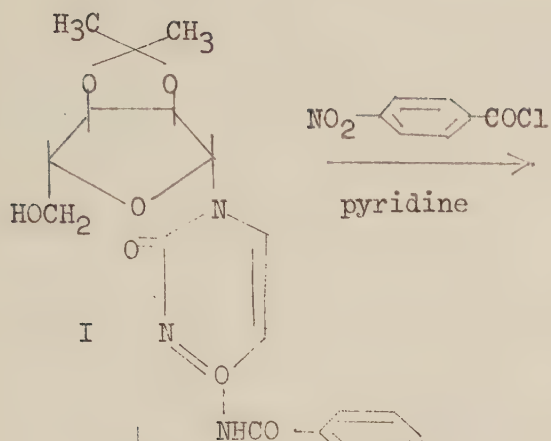
Spectre ultra-violet ($C = 5 \cdot 10^{-5}$ M/l dans le méthanol)

λ_{min} 224 nm $\epsilon = 9.600$, λ_{max} 243 nm $\epsilon = 13.800$

Epaulement à 258 nm $\epsilon = 11.400$

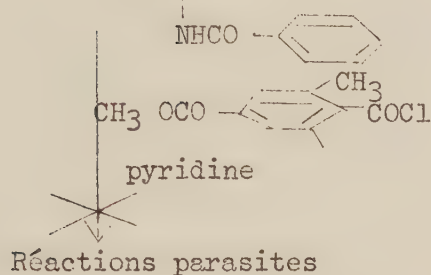
=====

Chapitre IV - Schémas réactionnels

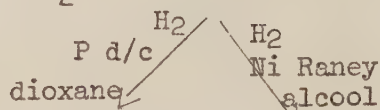


II

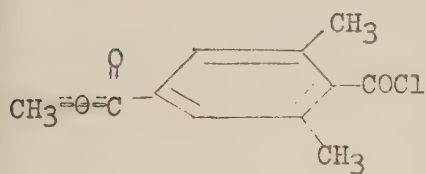
{ F 219°
90%



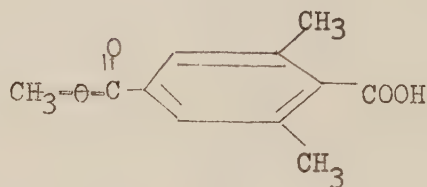
Réactions parasites



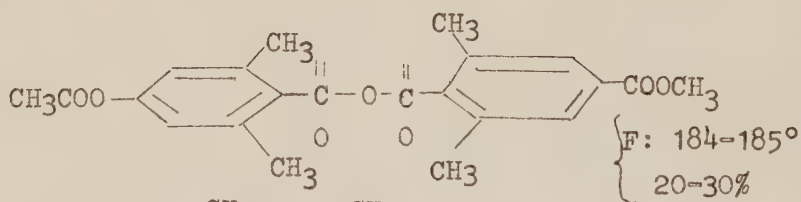
Destruction de la molécule



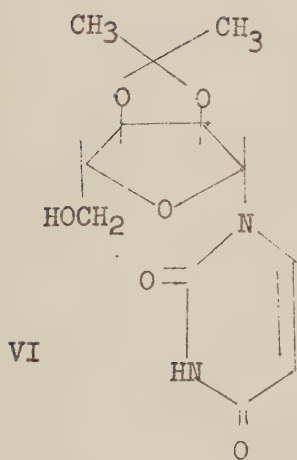
1) pyridine
2) eau



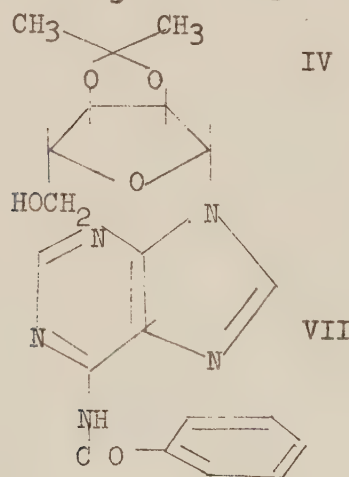
V



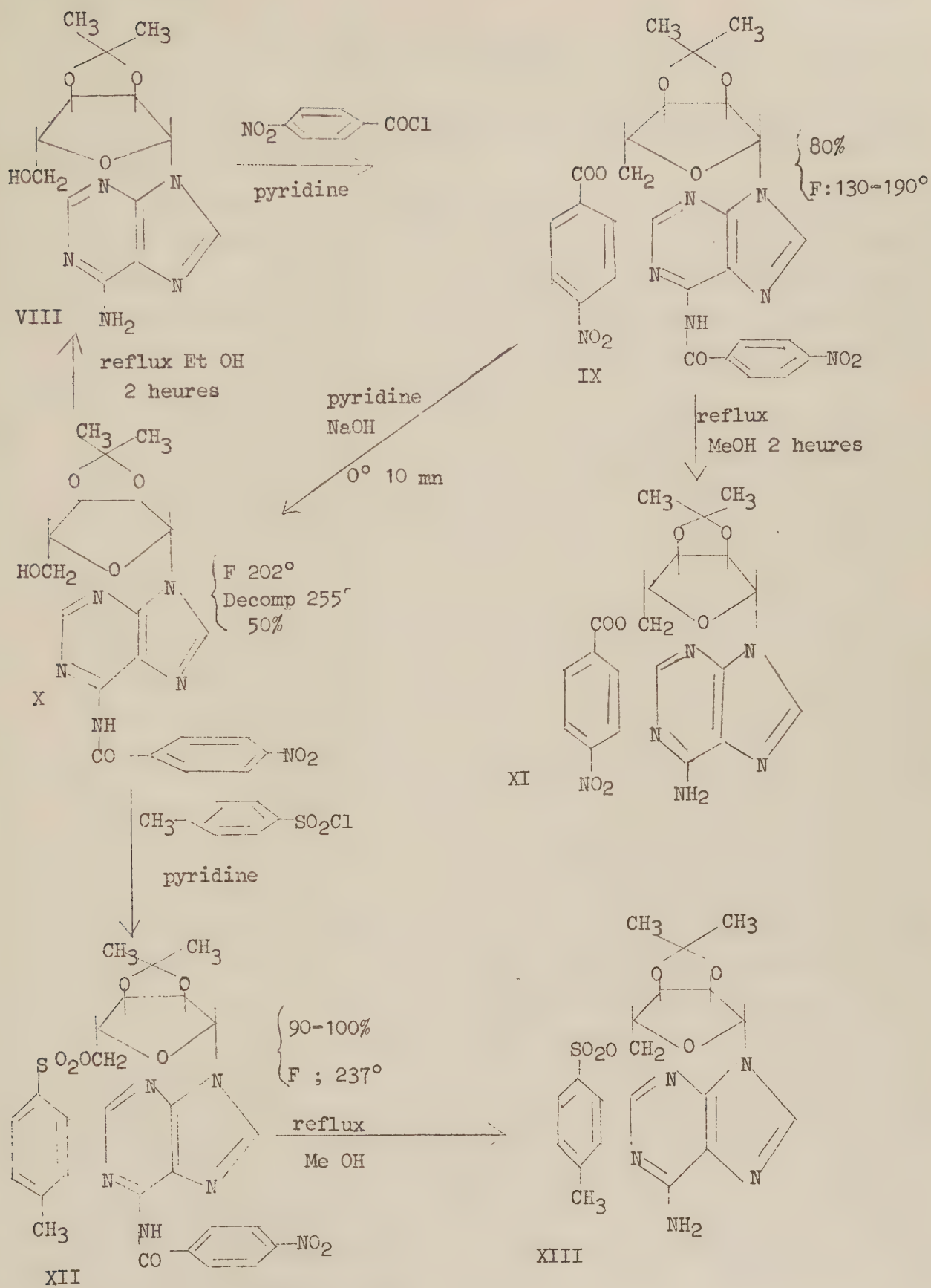
IV



VI



VII



CHAPITRE IV

=====

Réduction de la para-nitrobenzoyl-O-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-O-2',3' cytidine II

Par analogie avec les travaux effectués sur la thymidine et l'uridine, nous avons voulu préparer la para-nitrobenzoyl-O-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-O-2',3' cytidine II, dans l'intention d'obtenir la para-aminobenzoyl-O-5' cytidine, qui, après diazotation devait être condensée sur la serum albumine. Nous avons en effet vérifié que la cytidine ne se désamine pas dans les conditions d'une diazotation.

La benzoyl-N-4 isopropylidène-O-2',3' cytidine I a été traitée par le chlorure de para-nitrobenzoyle dans la pyridine pour donner, après une élaboration classique le para-nitrobenzoate II avec un rendement supérieur à 90%. Ce dernier a été recristallisé dans un mélange acétonitrile - eau et fondait à 219°.

Nous avons d'abord tenté la réduction de II par l'hydrogène et le nickel de Raney à température et pression ambiantes dans l'alcool. La méthode a dû être abandonnée, le produit d'arrivée s'étant révélé être un mélange fort complexe de substances non identifiées. Nous avons alors utilisé le palladium sur charbon à 10% dans le dioxane pour opérer cette réduction. Cette méthode avait été utilisée avec succès par Stevens et ses coll. (19) pour réduire un N-para-nitrobenzoate d'un nucléoside à base de cytosine. Cette fois encore, le produit d'arrivée était un mélange complexe dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice, en utilisant le mélange chloroforme-alcool (95 : 5) comme phase mobile, a révélé une dizaine de constituants majeurs. Ce mélange a été directement débenzoylé sur l'azote en utilisant le réactif hydrazine - acide acétique - pyridine mis au point par Letzinger, Miller et Grams (20) et chromatographié directement sur colonne de gel de silice, avec enregistrement à 260 mμ, en utilisant le chloroforme et l'alcool (9 : 1) comme phase mobile. Nous avons ainsi séparé 11 fractions dont chacune, après chromatographie sur couche mince, a révélé être un mélange de plusieurs produits. Parmi ceux-ci, nous avons trouvé de l'isopropylidène cytidine, de l'acide para-nitrobenzoïque, du para-nitrobenzoate d'éthyle (provenant sans doute d'une estérification sur la colonne), de l'acide para-aminobenzoïque et un produit migrant comme la cytosine. Les autres constituants du mélange n'ont pas été identifiés.

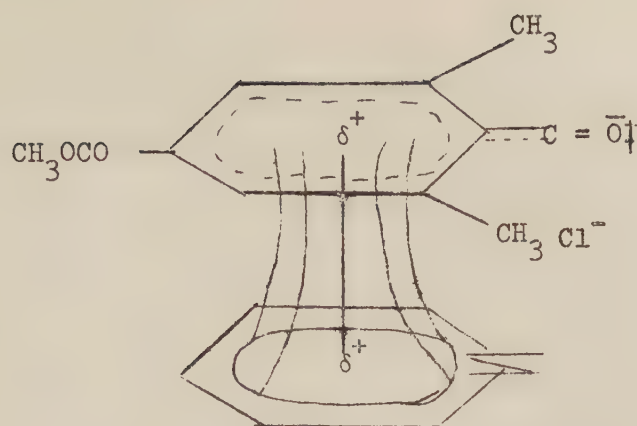
La réduction d'un para-nitrobenzoate de cytidine par des méthodes classiques étant pratiquement impossible, nous avons alors envisagé de préparer un diméthyl téraphtalate analogue à ceux qui ont été préparés pour l'uridine et la thymidine .

Réaction du chlorure de diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoyle sur la benzoyl-N-4 isopropilidène cytidine I :

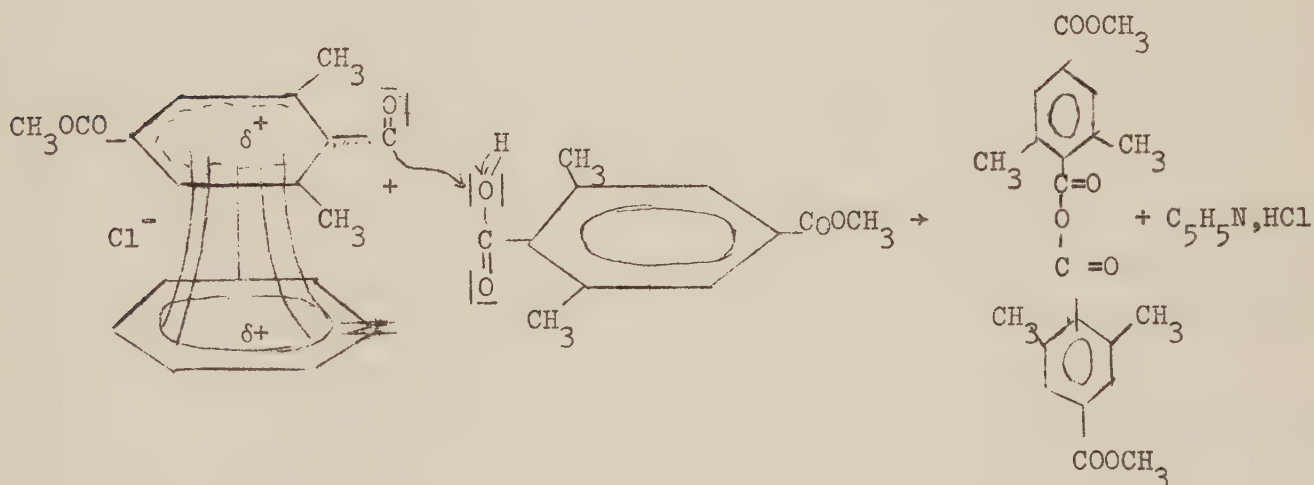
La préparation des diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoates de nucléosides par attaque directe d'une fonction alcool primaire ou secondaire d'un nucléoside convenablement protégé par le chlorure de diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoyle III dans la pyridine, s'est révélé très décevante, bien que cette méthode classique donne toujours d'excellents résultats avec les benzoates ou para-nitrobenzoates. Mis à part le cas de la thymidine, où cette dernière a pu être traitée sans groupement protecteur par le chlorure d'acide III dans la pyridine pour donner le benzoate en 5' correspondant avec un faible rendement (20%), on a récupéré chaque fois environ 50% d'acide diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoïque, le nucléoside protégé initial (uridine VI, cytidine I ou adénosine VII), un dérivé que nous avons supposé être l'anhydronucléoside correspondant, des gommes non identifiées et, dans tous les cas, 20 à 30% d'un produit "parasite" qu'après isolation et analyse s'est révélé être de l'anhydride diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoïque IV. Il semblait probable que cet anhydride se formait à partir du chlorure dans la pyridine sans autre intervention. C'est ce que nous avons vérifié expérimentalement en utilisant de la pyridine rigoureusement anhydre et du chlorure d'acide fraîchement distillé, donc exempt d'acide.

D'autre part, ce chlorure mis en présence de pyridine donne instantanément une coloration rouge sang, ce qui suggère la formation d'un complexe du genre π par exemple (21). Il est peu probable que ce complexe de transfert de charge évolue vers la formation d'un complexe σ , car on peut penser que si ce dernier se formait, il aurait pu être isolé à l'état solide et surtout ne serait pas aussi facilement détruit par l'eau (l'addition d'eau fait disparaître la coloration rouge foncé). De plus, pour des raisons stériques évidentes, un tel complexe ne pourrait guère se former.

Cette hypothèse pourrait donc contribuer à expliquer partiellement le manque de réactivité de ce chlorure dans nos conditions expérimentales.



La formation de l'anhydride IV se ferait à partir de ce complexe au moment où nous ajoutons de l'eau pour terminer la réaction. En effet, un chlorure d'acide ordinaire, mis en solution dans la pyridine ne donnerait que l'acide correspondant par addition brutale d'eau. Donc, dans cette hypothèse, une partie du complexe serait détruite par l'eau dans un premier stade pour donner l'acide V que nous avons toujours récupéré (50%) et du chlorhydrate de pyridinium. Cette attaque étant sans doute relativement lente par suite de l'encombrement stérique dû aux deux méthyles (comme dans l'hydrolyse par la soude de l'ester méthylique correspondant), il resterait encore un peu de "complexe π " qui attaquerait l'acide présent pour donner l'anhydride :



a La structure de cet anhydride a été confirmée en I.R. où on observe, en plus des bandes classiques, une forte bande à $1,790\text{ cm}^{-1}$ et attribuée aux carbonyles de l'anhydride. En R.M.N. les 4 protons aromatiques donnent un signal (à $\delta = 7,72\text{ ppm}$, les six protons des deux méthoxy à $\delta = 3,92\text{ ppm}$ et les 12 protons des 4 méthyles 2 et 6 à $\delta = 2,47\text{ ppm}$.

Para-nitrobenzoyl-N-6 isopropylidène-O-2',3' adénosine : X

Dans le même temps et dans l'intention d'obtenir un diméthylteréphthalate de l'adénosine en 5' soit par attaque du chlorure III sur la fonction alcool en 5', soit par action du sel de sodium sur le tosylate d'adénosine correspondant, nous avons préparé la para-nitrobenzoyl-N-6 isopropylidène adénosine X comme dérivé protégé en passant par le dipara-nitrobenzoate. Nous avons pensé utiliser un para-nitrobenzoate comme groupement protecteur sur l'azote car les N-benzoates ordinaires, utilisés comme tels, sont souvent éliminés par méthanolyse par simple chauffage à reflux, pendant plusieurs heures, dans le méthanol. Dans notre cas, il semblait probable qu'un N-para-nitrobenzoate serait encore plus facilement éliminé dans ces conditions, ce qui devait donc éviter l'usage de milieux basiques préjudiciables à la fonction ester en 5' ! De plus, le di-para-nitrobenzoate intermédiaire IX devait donner directement le para-nitrobenzoate-O-5' par simple reflux dans l'alcool et le para-nitrobenzoate-N-6 après tosylation en 5' devait donner directement le tosylate en 5' dans les mêmes conditions. Nous avons effectué toutes ces réactions et caractérisé tout particulièrement le N-paranitrobenzoate X, mais nous n'avons pas poursuivi dans cette voie étant donné l'instabilité en milieu basique des benzoates et téréphthalates de nucléosides et la difficulté de réduction du groupement -NO_2 comme dans le cas de la cytidine par exemple. Ces réactions sont donc simplement mentionnées ici. Le di-para-nitrobenzoate-N-6,-O-5' a été préparé en faisant réagir le chlorure de para-nitrobenzoyl sur l'isopropylidène adénosine VIII (22) dans la pyridine. Ce dérivé n'a pas pu être obtenu rigoureusement pur étant donné que sa purification finale passe par une recristallisation dans l'alcool qui s'accompagne d'une débenzoylation sur l'azote avec apparition du para-nitrobenzoate en 5' XI qui recristallise avec IX.

Ce di-para-nitrobenzoate a été ensuite dibenzoylé en 5' par traitement à 0° pendant 10 minutes par un mélange pyridine-soude 1N (1 : 1) (23) pour donner X qui a pu être recristallisé dans l'éthanol à condition d'opérer aussi rapidement que possible. En effet, le reflux dans l'éthanol s'accompagne d'une rapide débenzoylation de l'azote en donnant de l'isopropylidène adénosine VIII et du para-nitrobenzoate-d'éthyle (Rend. 100%). La réaction est totale en deux heures, et a été suivie à la fois par chromatographie sur couche mince et en ultra-violet. Le para-nitrobenzoate de départ a deux maximum d'absorption : à 260 mμ ($\epsilon = 20.500$) et 283 mμ ($\epsilon = 18.200$)

Après deux heures de reflux dans l'alcool, la maximum à 283 nm caractéristique des N-benzoates a disparu alors que le maximum d'absorption à 260 nm s'est déplacé à 257 nm (ϵ 25.500). Le spectre U.V. est alors la superposition de celui de l'isopropylidène adénosine et du para-nitrobenzoate d'éthyle.

On peut signaler enfin que X traité par le chlorure de tosyle dans la pyridine donne le tosylate XII avec un rendement quantitatif. Sa recristallisation dans l'alcool s'accompagne encore d'une débenzoylation sur l'azote.

o

o o

Partie Expérimentale

Réaction du chlorure de diméthyl-2,6 carbomethoxy-4 benzoyle dans le pyridine.

On dissout 0,616 g de chlorure d'acide dans 6 ml de pyridine anhydre fraîchement distillée sur potasse. La solution devenue rouge sang après quelques minutes, est abandonnée 4 jours à température ambiante. Cette solution est ensuite versée brutalement dans 100 ml d'eau et la phase aqueuse décantée après avoir laissé déposer pendant plusieurs heures le solide rouge (0,215 g après séchage). F. 160-165°. Ce dernier a été recristallisé dans le méthanol. F. 184-185°. C'est l'anhydride IV.

Analyse : $C_{22}H_{22}O_7$

Calculé % : C : 64,69 H: 5,39

Trouvé % : 65,24 5,53

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

1.730 cm^{-1} (CO anhydre) ; 1.720 cm^{-1} (CO ester)

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 MC, $CDCl_3$, TMS réf. int.)

CH aromatiques : 7,72 ppm (4 protons)

OCH_3 : 3,92 ppm (6 protons)

CH_3 : 2,47 ppm (12 protons)

Para-nitrobenzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' adénosine X et di-para-nitrobenzoyl-N-4-0-5' isopropylidène-0-2'3' adénosine IX

9,210 g (3.10^{-2} mole) d'isopropylidène adénosine VIII et 11,700 g ($6,3.10^{-2}$ mole, soit 2,1 équivalents) de chlorure de para-nitrobenzoyle sont dissouts dans 100 ml de pyridine anhydre fraîchement distillée sur potasse. On abandonne 24 heures à température ambiante à l'abri de l'humidité, puis verse dans 1 l d'eau et de glace et extrait au chloroforme (3 x 125 ml). La phase organique est lavée successivement par 300 ml d'une solution saturée de $NaHCO_3$, à l'eau (2 fois), puis séchée sur sulfate de sodium avant évaporation à sec. (30°). On obtient un solide jaune qui est le di-paranitrobenzoate IX. Ce dernier a été recristallisé une fois dans l'alcool et deux fois dans l'acétonitrile (14,520 g $2,4.10^{-2}$ mole. 80%). L'analyse donnée ci-dessous est approximative. La chromatographie sur couche mince le gel de silice montre que ce produit contient des traces du monobenzoate XI.

Analyse : $C_{27}H_{23}N_7O_{10} = 605,17$

Calculé % :	C : 53,57	H : 3,80	N : 16,19
Trouvé % :	54,41	3,47	15,30
	54,48	3,51	15,30

Spectre Infra-rouge (dans le nujol)

Pas de bande hydroxyle ; 3.330 et 3070 cm^{-1} (N-H) ; 1.710 cm^{-1} (C=O , benzoate en 5') ; 1.660 cm^{-1} (C=O amide) ; 1.590 cm^{-1} (NH et CN) ; 1.530 cm^{-1} , 1.330 cm^{-1} et 870 cm^{-1} fortes bandes (NO₂ aromatique) ; 1.060 cm^{-1} et 1.040 cm^{-1} (C-O éther).

Le dibenzoate précédent (14,520g) est dissout dans 200 ml de pyridine et la solution refroidie à 0°. On ajoute 200 ml de soude 1,0N également à 0°, agite et maintient le mélange à cette température pendant dix minutes. La solution est ensuite amenée à pH 7 par l'acide formique avant évaporation à sec (t < 30°). Le solide blanc obtenu est mis en suspension dans 300 ml d'eau et extrait au chloroforme (3 x 150 ml). La solution chloroformique est lavée comme précédemment, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec (t < 30°) pour donner 13,6 g d'un solide légèrement jaune qui est recristallisé aussi rapidement que possible dans l'alcool (en évitant une longue ébullition). On obtient ainsi 7,000 g de cristaux (1,53.10⁻³ mole. 50%). L'échantillon analytique a été recristallisé une fois supplémentaire dans l'alcool. F. 202°. Décomp. à 255°.

Analyse : $C_{20}H_{20}N_6O_7 = 456,91$

Calculé % :	C : 52,63	H : 4,42	N : 18,42
Trouvé % :	52,78	4,44	18,25

Spectre ultra-violet (C = 5,6.10⁻⁵ M/l dans EtOH)

λ_{max} 211 nm $\epsilon = 23.000$, λ_{min} 231 nm $\epsilon = 10.000$,
 λ_{max} 260 nm $\epsilon = 20.500$, λ_{min} 273 nm $\epsilon = 15.900$,
 λ_{max} 283 nm $\epsilon = 18.200$

Chromatographie : gel de silice Prolabo en couche mince. Phase mobile : n-butanol - eau (85 : 15). Une seule tache visible en U.V. $R_F = 0,80$.

En concentrant les eaux de recristallisation et en laissant reposer quelques temps, on récupère de l'isopropylidène adénosine ($R_F = 0,61$) et en rajoutant ensuite de l'eau, on précipite du para-nitrobenzoate d'éthyle ($R_F = 0,90$) .

Spectre de résonance magnétique nucléaire (60 MC, DMSO-d₆, TMS réf. int.)

NH en 6 : singulet, $\delta = 11,65$ ppm

H en 8 : singulet, $\delta = 8,78$ ppm

H en 2 : singulet, $\delta = 8,72$ ppm

4 protons aromatiques, $\delta = 8,31$ ppm

H_{1'}, doublet, $\delta = 6,60$ ppm; $J_{1,2'} = 2,8$ c/s

H_{3'}, $\delta = 5,45$ ppm, $J_{3,2'} = 5,7$ c/s et $J_{3,4'} = 2,5$ c/s

OH_{5'}, triplet partiellement recouvert par le signal de H_{2'}, $\delta = 5,17$ ppm,
 $J = 5$ c/s

H_{2'}, massif autour de $\delta = 5,02$ ppm, $J_{2,1'} = 2,8$ c/s, $J_{2,3'} = 5,7$ c/s.

H_{4'}, massif, $\delta = 4,32$ ppm

2 H_{5'}, $\delta = 3,60$ ppm, $J_{5,4'} = 5,2$ c/s.

2 CH₃ isopropylidène, 2 singulets à $\delta = 1,58$ et $\delta = 1,37$ ppm

Alcoollyse en isopropylidène-0-2',3' adénosine

On chauffe à reflux 15 mg d'isopropylidène-0-2',3'-N-6 para-nitro-benzoyl adénosine X dans 15 ml d'alcool absolu. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince dans le système précédent et un U.V. à intervalles de temps réguliers. Le produit de départ présente une seule tache ($R_F = 0,80$). Au fur et à mesure que le reflux se poursuit, on voit apparaître de l'isopropylidène adénosine ($R_F = 0,61$) et du para-nitrobenzoate d'éthyle ($R_F = 0,89$). La tache du produit de départ X s'estompe progressivement pour disparaître totalement après deux heures de reflux.

Mesures en U.V. ($C = 5,65 \cdot 10^{-5}$ mole/l dans EtOH)

temps en minutes :	0	15	30	60	120	200
d 260 mμ	1,05	1,30	1,33	1,44	1,52	1,55
d 283 mμ	1,03	0,79	0,64	0,51	0,28	0,23

Para-toluène sulfanyl-0-5' para-nitrobenzoyl-N-6 isopropylidène-0-2',3' adénosine XII

4,570 g du N-benzoate X (10^{-2} mole) et 1,905 g de chlorure de tosyle (10^{-3} mole) sont dissouts dans 25 ml de pyridine anhydre et abandonnés 24 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans 500 ml d'eau et de glace avec agitation. Le solide blanc qui précipite (6,200 g) est filtré et dissout dans du chloroforme. Cette solution est lavée par NaHCO₃, à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec (30°). On obtient une poudre blanche (6,000 g) qui, après recristallisation dans

l'alcool, fondait à 235-237°C. La chromatographie sur couche mince dans le système précédent montre que ce tosylate est toujours accompagné de quelques traces d'un produit migrant moins vite et qui est supposé être le produit de débenzoylation XIII. L'analyse montre en effet un excès d'azote et un défaut de carbone.

Analyse $C_{27}H_{26}N_6O_5S = 594,53$

calculé % :	C : 54,54	H : 4,41	N : 14,14
trouvé % :	52,03	4,42	15,69
	52,16	4,31	15,74

Spectre ultra-violet ($C = 5.10^{-5}$ mole/l dans EtOH)

λ_{max} 222 nm $\epsilon = 23.000$, λ_{min} 240 m μ $\epsilon = 12.600$,

λ_{max} 260 nm $\epsilon = 21.000$, λ_{max} 283 m μ $\epsilon = 18.100$,

Benzoyl-N-4 para-nitrobenzoyl-O-5' isopropylidène-O-2',3' cytidine

A été préparé classiquement en faisant réagir des quantités équimoléculaires de N-benzoyl isopropylidène cytidine I avec le chlorure de para-nitrobenzoyle dans la pyridine pendant 24 heures. Par précipitation dans l'eau, filtration et recristallisation dans un mélange CH_3CN-H_2O on obtient (90%) de fines aiguilles. F. = 219°.

Mis à part le spectre U.V. attendu, ce dérivé n'ayant pu être réduit n'a pas été davantage caractérisé.

Deuxième Partie

Chapitre I

Para-nitrophenyl-O-5' thymidine et uridine

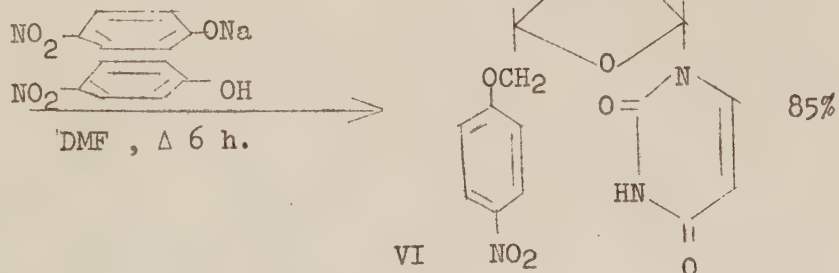
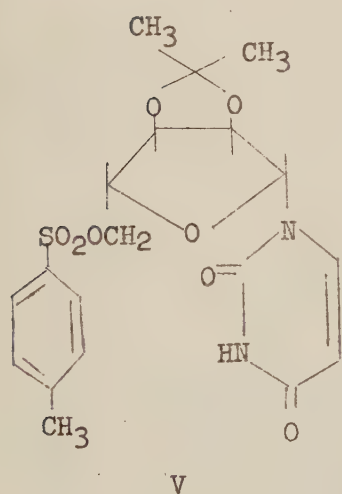
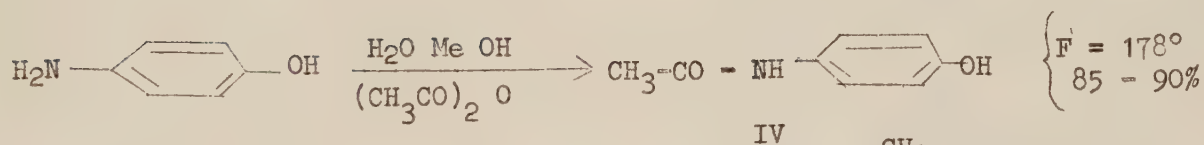
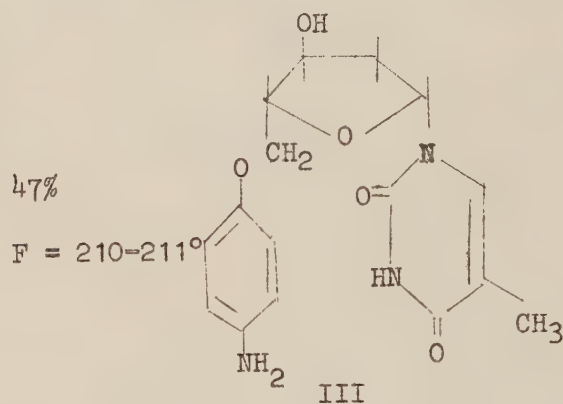
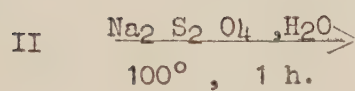
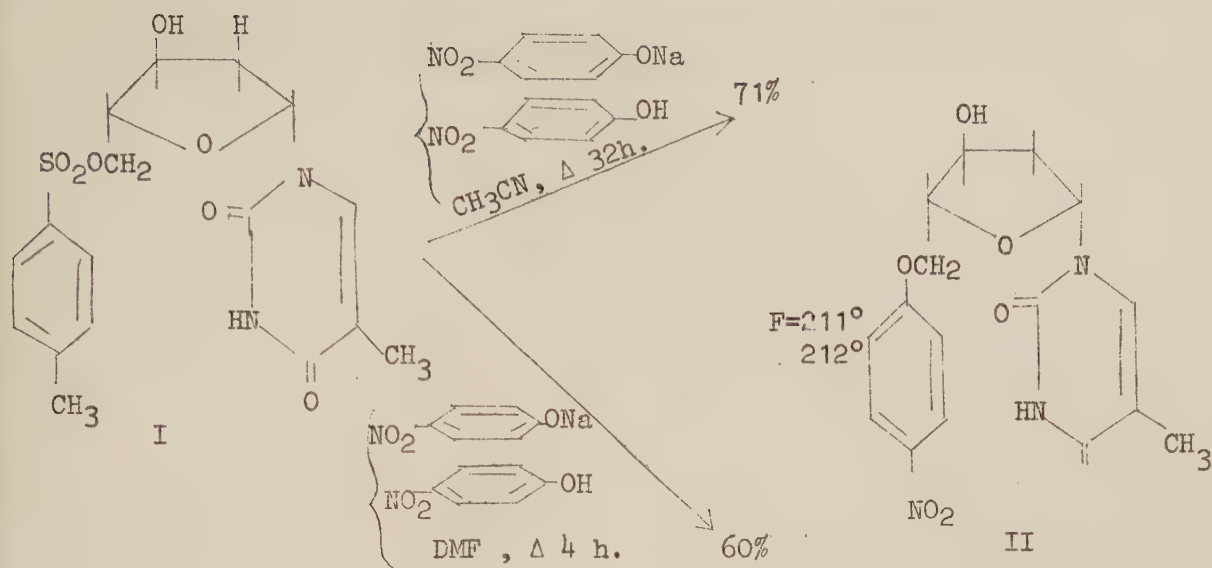
Para-aminophényl-O-5' thymidine et uridine

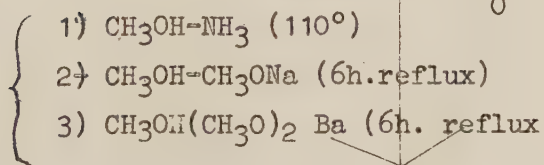
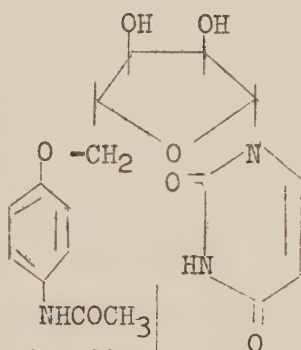
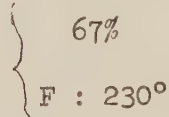
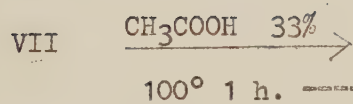
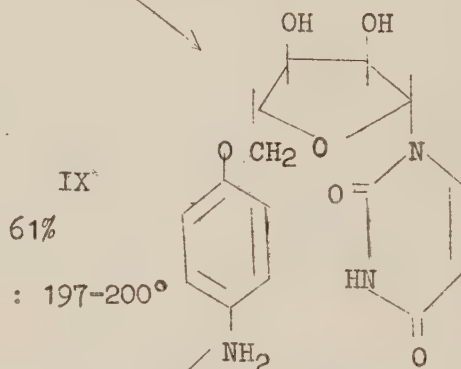
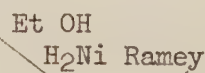
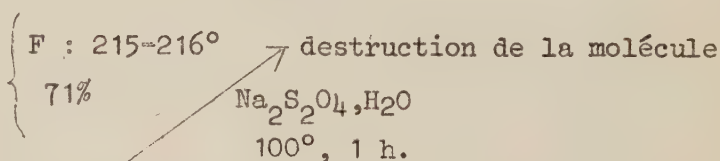
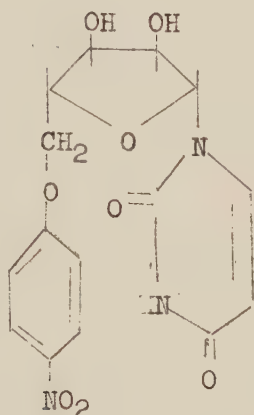
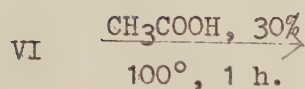
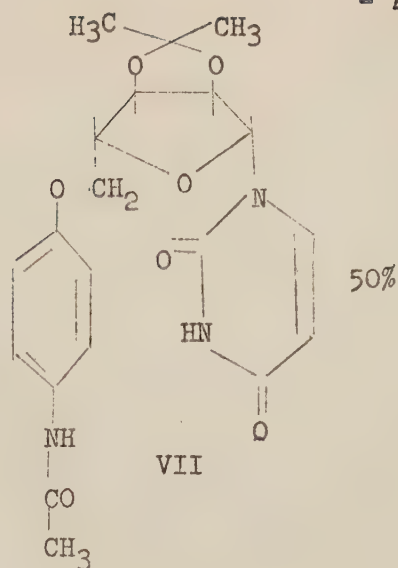
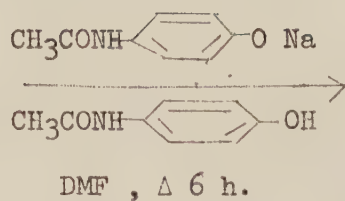
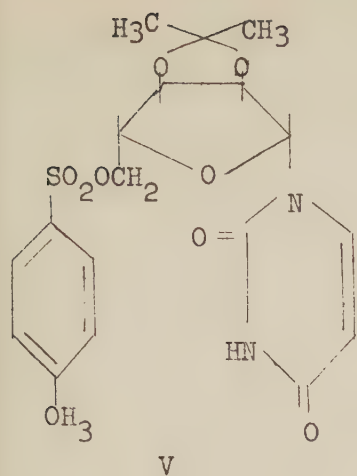
Chapitre II

Para-nitrophenyl-O-5' cytidine

=====

Chapitre I - Schémas réactionnels





C H A P I T R E I

Para-aminophényl-0-5' thymidine et uridine

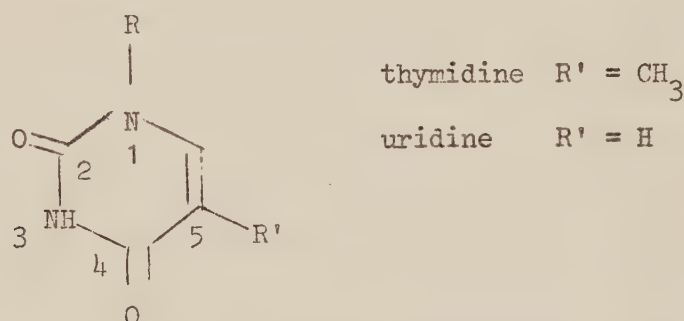
Les différents benzoates et diméthyl-2",6" benzoates que nous avons préparés jusqu'ici s'étaient révélés très labiles en milieu alcalin, par suite d'une participation intramoléculaire de l'oxygène en 2 de la pyrimidine au mécanisme d'hydrolyse. Recherchant alors un "lien" plus stable entre la protéine et la nucléoside, nous avons pensé utiliser le groupement para-aminophényl qui présentait l'avantage d'être insensible à la basicité du milieu et qui, de plus, était également stable en milieu acide modéré. Les para-aminophényl-0-5' thymidine et uridine synthétisés ici, présentent ces deux propriétés.

L'attaque nucléophile de la tosyl-0-5' thymidine I (13) par quatre équivalents de para-nitrophénate de sodium en présence d'un équivalent de para-nitrophénol dans la DMF anhydre, à reflux pendant 4 heures, nous a donné la para-nitrophényl-0-5' thymidine II avec un rendement voisin de 80%. Ce dernier a été également obtenu avec un rendement de 71% en remplaçant la DMF par l'acétonitrile. Mais ici la réaction est considérablement plus longue (32 heures). Ce dérivé nitré a été réduit en para-aminophényl-0-5' thymidine III par l'hydrosulfite de sodium dans l'eau. Ce para-aminophényl éther est remarquablement insoluble dans tous les solvants usuels et n'a pu être recristallisé.

Enfin, le spectre de résonance magnétique nucléaire montre que la substitution a bien eu lieu comme prévu sur le sucre et que la pyrimidine est restée intacte dans cette réaction. D'autre part, la réduction du groupement nitré en amino est confirmée par le spectre ultra-violet. En effet, la para-nitrophényl-0-5' thymidine présente ici deux maximum d'absorption ($\lambda = 272 \text{ nm}$, $\epsilon = 13.700$ et $\lambda = 301 \text{ nm}$, $\epsilon = 11.600$) en accord avec les spectres de thymidine ($\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$, $\epsilon = 9.750$) et de para-nitrophenol ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$, $\epsilon = 10.000$) pris dans le méthanol. La réduction en para-aminophényl-0-5' thymidine est confirmée par la disparition du maximum à 301 nm (épaulement à $\lambda = 300 \text{ nm}$, $\epsilon = 2.500$) et l'apparition d'un maximum d'absorption à 237 nm ($\epsilon = 12.250$) comme le laissait prévoir le spectre ultra-violet du para-aminophénol ($\lambda_{\text{max}} = 229 \text{ nm}$, $\epsilon = 6.060$ et $\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ nm}$, $\epsilon = 1.870$).

La para-nitrophényl-0-5' uridine VIII a été préparée de manière similaire en traitant la para-toluène sulfonyl-0-5' isopropylidène-0-2',3' uridine V (16) par le para-nitrophénate de sodium dans la DMF à reflux en présence de para-nitrophénol pour donner la para-nitrophényl éther VI qui n'ayant pu être recristallisée a été purifiée sur gel de silice. Le groupement isopropylidène protecteur a été éliminé par chauffage à 100° dans l'acide acétique à 33% pendant deux heures pour donner la para-nitrophényl-0-5' uridine VIII, solide cristallin, avec un rendement voisin de 65% calculé sur la base du tosylate de départ. Ici encore les différents spectres confirment la structure du produit attendu.

Nous avons ensuite essayé de réduire ce dérivé nitré en para-aminophényl-0-5' uridine IX en utilisant comme précédemment l'hydrosulfite de sodium dans l'eau comme réducteur. L'échec fut total et aucun produit présentant la moindre absorption en ultra-violet n'a pu être isolé du mélange réactionnel. La même réaction ayant été utilisée avec succès pour réduire la para-nitrophényl-0-5' thymidine, on peut supposer que dans le cas de l'uridine,



où la position 5 de l'uracil n'est pas substituée et de surcroît ce centre étant nucléophile, il s'y produit une attaque électrophyle par l'hydrosulfite de sodium avec ouverture ultérieure du cycle et formation d'un acide fort, de type sulfonique. Cette dernière hypothèse expliquerait que le mélange réactionnel, mis sur résine Dowex-2(OH⁻) n'ait pu en être élué même par HCl 0,5N.

Le même phénomène ayant été observé par la suite en essayant de réduire dans les mêmes conditions la para-nitrophényl-0-5' cytidine, il semblerait que l'utilisation de l'hydrosulfite de sodium comme réducteur des groupements nitrés, soit réservée aux dérivés de la thymidine, c'est-à-dire les nucléosides pyrimidiniques dont la position 5 de la base est substituée. La para-nitrophényl-0-5' uridine a finalement pu être réduite en para-aminophényl-0-5' uridine IX par le nickel de Raney et l'hydrogène dans l'alcool.

Ici encore l'hydrogénolise semble avoir tendance à se produire et on la limite en utilisant de faibles quantités de nickel. Cette amine a été également caractérisée par son dérivé N-acétylé X obtenu par traitement de l'amine par l'anhydride acétique dans le mélange eau-méthanol. D'autre part, après diazotation et condensation sur la serum albumine bovine dans les conditions usuelles, nous avons obtenu une protéine qui, après dégradation et dosage de l'uracile, isolé par chromatographie sur papier, contenait un minimum de 24 groupements par mole.

Nous avons également envisagé une synthèse directe de ces para-aminophényl éthers en substituant directement un groupement tosyl par le para-acétamidophénate de sodium. L'élimination ultérieure du groupement protecteur N-acétyl devait nous conduire directement à l'amine. Cette réaction a été appliquée en premier lieu à l'uridine.

En traitant la tosyl-O-5' isopropylidène-O-2',3' uridine V par le para-acétamidophénate de sodium à reflux dans le DMF en présence de para-acétamidophénol, nous avons obtenu, après chromatographie directe du mélange réactionnel brut sur gel de silice, la para-acétamidophényl-O-5' isopropylidène-O-2',3' uridine VII avec un rendement voisin de 55%. Le para-acétamidophénol,

acide très faible ($9 < pK_a < 10$) dont l'anion est très peu nucléophile, il est assez remarquable que la substitution aie pu atteindre un tel rendement. L'élimination de l'isopropylidène a donné le dérivé acétylé correspondant identique à celui qui a été préparé plus haut.

Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'éliminer le groupement acétyl sur l'azote pour obtenir l'amine libre. Ce dernier a résisté au méthanol saturé à 0° par NH_3 en bombe à 110°, en reflux 6 heures dans une solution de MeOH-MeONa, enfin à une solution normale de $Ba(OCH_3)_2$ dans MeOH mise au reflux 6 heures.

Partie Expérimentale

Para-nitrophényl-0-5' thymidine II

a) Premier procédé : On dissout 1,000 g ($2,52 \cdot 10^{-3}$ mole) de tosyl-0-5' thymidine, 1,610 g de para-nitrophénate de sodium (4 équivalents, soit $1,08 \cdot 10^{-2}$ mole) et 0,347 g de para-nitrophénol (1 équivalent) dans 65 ml d'acétonitrile anhydre et chauffe à reflux à l'abri de l'humidité pendant 32 heures. La réaction a été suivie sur couche mince de gel de silice en utilisant le mélange chloroforme-alcool (85 : 15) comme phase mobile. Le mélange réactionnel est évaporé à sec et la gomme résiduelle dissoute dans 250 ml de chloroforme et 250 ml d'eau. On filtre éventuellement les produits insolubles. La phase organique est lavée à l'eau (3x) et les extraits aqueux ou chloroforme (2x). Les extraits chloroformiques sont séchés sur Na_2SO_4 et évaporés à sec. Le solide obtenu est mélangé à l'insoluble précédemment filtré. On obtient ainsi 0,650 g ($1,7 \cdot 10^{-3}$ mole soit 71%) d'un solide jaune qui a été recristallisé dans l'acétonitrile puis le méthanol pour l'analyse $F = 211^\circ$.

b) Deuxième procédé : La réaction a été également effectuée en utilisant les mêmes réactifs dans les mêmes proportions mais en chauffant 4 heures à reflux dans le DMF fraîchement distillé sur anhydride phosphorique. Après élimination du DMF sous vide, le résidu est traité comme précédemment pour obtenir un solide jaune (80%) qui contenait encore des traces de para-nitrophénol et qui a été recristallisé comme indiqué ci-dessus (60%). $F = 211-212^\circ$.

Analyse : $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$, $M = 363,32$

calculé %	C : 52,89	H : 4,7	N : 11,57
trouvé %	52,7	4,86	11,7
	52,65	4,71	
		4,61	

Spectre ultra-violet ($C = 1,13 \cdot 10^{-4}$ mole/l dans CH_3OH)

$\lambda_{\min} 241 \text{ nm } \epsilon = 5.07$, $\lambda_{\max} 272 \text{ nm } \epsilon = 13.680$,

$\lambda_{\min} 291 \text{ nm } \epsilon = 11.250$, $\lambda_{\max} 301 \text{ nm } \epsilon = 11.600$

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.460 cm^{-1} (OH), 3.170 cm^{-1} (NH thymine), 1.700 et 1.690 cm^{-1} (C=O thymine), 1.510 cm^{-1} (NO_2 aromatique), 1.270 cm^{-1} (éther aromatique, 1.055 cm^{-1} (C=O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO-d₆, 60 mégacycles, T.M.S. référence interne).

NH en 3, singulet, $\delta = 11,42$ ppm

2 protons aromatiques, $\delta = 8,32$ ppm $J_{5''6''} = J_{3''2''} = 9$ c/s

H₆, singulet, $\delta = 7,5$ ppm

2 protons aromatiques (2'' et 6''), $J_{6''5''} = 9$ c/s, $\delta = 7,27$ ppm

H_{1'}, triplet, $\delta = 6,31$ ppm, $J_{1'2'} = 6,6$ c/s

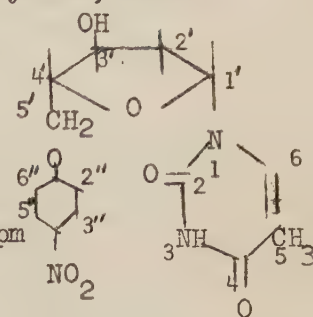
OH₃, doublet, $\delta = 5,52$ ppm, $J = 4,0$ c/s

2 H_{5'} et H_{3'}, massif, $\delta = 4,42$ ppm

H₄, massif, $\delta = 4,20$ ppm, $J_{4'5'} = 3$ c/s

2 H_{2'}, massif $\delta = 2,30$ ppm, $J_{2'1'} = 6,6$ c/s

CH₃ en 5, singulet, $\delta = 1,8$ ppm



Para-aminophényl-O-5' thymidine III

On met en suspension 0,980 g ($2,80 \cdot 10^{-3}$ mole) du dérivé nitré précédent dans 65 ml d'eau contenant 1,5 g d'hydrosulfite de sodium et chauffe 1 h 30 sur bain-marie bouillant en agitant de temps à autre. On filtre l'insoluble et évapore à sec. Le résidu après rigoureux séchage sous vide phosphorique, est extrait deux fois par 25 ml de pyridine anhydre bouillante qui, après filtration, est évaporée à sec. Le résidu est repris par l'alcool absolu et réévaporé à sec (3 fois). On obtient 0,950 g d'un solide dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice fluorescent dans le système CHCl₃-EtOH (90 : 10) indique quatre constituants essentiels. Ce produit a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n° 2.847, 100 mesh. $\phi = 2,8$ cm H = 45 cm). Les fractions de 14 ml environ ont été recueillies sur un collecteur de fractions automatique muni d'un analyseur d'effluent, à 260nm l'éluant utilisé étant le mélange chloroforme-alcool (90 : 10). Dans ces conditions la para-aminophényl-O-5' thymidine a été éluée entre les fractions 67 et 110 (0,460 g, $1,30 \cdot 10^{-3}$ mole. 47%) et était pure par chromatographie sur couche mince. Un échantillon a été lavé par du méthanol chaud avant analyse et se présentait sous forme d'une poudre blanche amorphe pratiquement insoluble dans tous les solvants usuels. $F = 210-211^\circ$.

Chromatographie : couche mince de gel de silice fluorescent Prolabo.

CHCl₃ - EtOH (80 : 20). $R_F \neq 0$, D

Analyse : $C_{16}H_{19}N_3O_5$, $M = 333,34$

Calculé % : C : 57,65 H : 5,7 N : 12,61

Trouvé % : 57,7 5,87 12,44

Spectre ultra-violet : ($C = 1,20 \cdot 10^{-4}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 237 nm $\epsilon = 12.250$, λ_{min} 255 nm $\epsilon = 8.500$, λ_{max} 266 nm $\epsilon = 9.250$,
épaulement vers 300 nm $\epsilon = 2.500$

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.390 et 3.370 cm^{-1} (N-H aromatique), 3.300 cm^{-1} (OH), 3.100 cm^{-1} (NH thymine), 1.690 et 1.670 cm^{-1} (C=O uracil), 1.095 et 1.065 cm^{-1} (C-O éther)

Para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' uridine VI

5,150 g de tosyl-0-5' isopropylidène uridine ($1,17 \cdot 10^{-2}$ mole), 1,626 g de para-nitrophenol ($1,17 \cdot 10^{-2}$ mole) et 7,534 g de para-nitrophénate de sodium sont dissouts dans 60 ml de DMF anhydre et chauffés à reflux en atmosphère anhydre pendant 6 heures. On ajoute un peu d'eau et évapore à sec sous vide. Le résidu est dissout dans 300 ml de chloroforme et 300 ml d'eau. La phase chloroformique est lavée par une solution aqueuse saturée en $KHCO_3$ (4×500 ml), à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4 avant évaporation à sec. On obtient ainsi 5,500 g d'une gomme noire qui a été purifiée sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n° 2.847, 100 mesh. $\phi = 4$ cm, $H = 60$ cm) en éluant successivement par le chloroforme (0,500 l), le mélange $CHCl_3$ - EtOH (95 : 5) (2,21) et enfin $CHCl_3$ - EtOH (90 : 10) jusqu'à élution du produit. Le repérage du produit a été effectué en utilisant un collecteur automatique muni d'un analyseur d'effluents réglé sur 280 nm. On obtient ainsi 4,000 g (10^{-2} mole, 85%) d'un verre qui n'a pu être recristallisé et qui s'est révélé être pratiquement ^{pur} sur couche mince de gel de silice, fluorescent prolabo ($R_F \neq 0,53$ - $CHCl_3$ - EtOH (90 : 10) phase mobile).

Para-nitrophényl-0-5' uridine VIII

On chauffe pendant deux heures à 100° 4,000 g (10^{-2} mole) de l'isopropylidène précédent dans 50 ml d'acide acétique à 30% et laisse la solution revenir lentement à température ambiante. La para-nitrophényl-0-5' uridine ne tarde pas à cristalliser et le tout est abandonné une nuit à 0° . Les cristaux sont filtrés et lavés à l'eau (3,600 g - $F = 200^\circ$) et recristallisés dans l'eau en s'aidant d'un peu de méthanol (2,600 g - 71 %). $F = 215-216^\circ$. Ce point de fusion est inchangé par mélange avec un échantillon authentique de para-nitrophényl-0-5' uridine préparé à partir de cytidine (chapitre 2).

Spectre ultra-violet ($C = 7,40.10^{-5}$ mole/l dans MeOH).

$\lambda_{\min} 240 \text{ nm } \epsilon = 6.080$, $\lambda_{\max} 267 \text{ nm } \epsilon = 12.600$, $\lambda_{\min} 286 \text{ nm } \epsilon = 9.900$,
 $\lambda_{\max} 303 \text{ nm } \epsilon = 11.620$. Epaulement à $226 \text{ nm } \epsilon = 10.000$.

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.400 et 3.220 cm^{-1} (OH), 3.100 cm^{-1} (NH uracile), 1.690 et 1.670 cm^{-1}
 (C=O uracil), 1.505 et 1.350 cm^{-1} (NO_2 aromatique), 1.27 cm^{-1} (éther aroma-
 tique), 1.080 , 1050 et 1030 cm^{-1} (C=O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO-d_6 , 60 mégacycles, T.M.S.
 référence interne).

NH en 3, $\delta = 11,35 \text{ ppm}$, singulet

2 protons aromatiques, $\delta = 8,25 \text{ ppm}$, $J_{3"2"} = J_{5"6"} = 9 \text{ c/s}$

H en 6, $\delta = 7,7 \text{ ppm}$, doublet, $J_{6,5} = 8,2 \text{ c/s}$

2 protons aromatiques, $\delta = 7,25 \text{ ppm}$, $J_{2"3"} = J_{6"5"} = 9 \text{ c/s}$

H_1 et H_5 , 2 doublets, $\delta = 5,85 \text{ ppm}$ et $5,7 \text{ ppm}$, $J_{5,6} = 8,2 \text{ c/s}$,
 $J_{1,2} = 3,7 \text{ c/s}$

OH_2 et OH_3 , massif, $\delta \approx 5,55 \text{ ppm}$

H_2' , H_3' , H_4 et 2 H_5' , deux "singulets", $\delta = 4,40$ et $4,20 \text{ ppm}$

Para-aminophényl-O-5' uridine IX

On dissout $3,000 \text{ g}$ ($8,21.10^{-3}$ mole) de para-nitrophényl-O-5' uridine
 dans 300 ml d'alcool et hydrogène à température et pression ambiantes en
 présence de $3,0 \text{ g}$ de nickel de Raney (dépôt dans l'eau), auparavant soi-
 gneusement lavé dans l'eau jusqu'à neutralité. Après $3 \text{ h } 30 \text{ mn}$ la réaction
 avait consommé $0,600 \text{ l}$ d'hydrogène. On chauffe pour redissoudre le préci-
 pité, filtre et évapore à sec. Le solide blanc obtenu est redissout dans
 l'alcool avec l'aide d'un peu d'eau. On ajoute un peu de charbon actif, porte
 à ébullition quelques minutes et filtre. Au refroidissement la solution
 dépose des aiguilles blanches ($1,690 \text{ g} = 5,04.10^{-3}$ mole - 61%).

$F = 197-200^\circ$ (décomp.)

Analyse : $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6$ = 335,31

Calculé % : C : 53,73

H : 5,11

N : 12,53

Trouvé % : 53,94

5,12

12,51

Spectre ultra-violet ($C = 6,33 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{min} 222 nm $\epsilon = 9,4$ D, λ_{max} 238 nm $\epsilon = 13,70$, Epaulement vers 258 nm $\epsilon = 10,70$, λ_{max} 300 nm $\epsilon = 2,210$

Spectre infra-rouge (dans le nujol-)

Toutes les bandes NO_2 aromatiques précédentes (1.500, 1.350 et 850 cm^{-1}) ont disparu.

3.460 et 3.3 D cm^{-1} (N-H amine), 3.060 cm^{-1} (N-H uracil), 1.700 et 1.6 D cm^{-1} (C=O uracil), 1.2 D cm^{-1} (éther aromatique), 1.250 cm^{-1} (C-N amine aromatique), 1.085, 1.060 et 1.040 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 mégacycles, T.M.S. réf. interne).

NH en 3, singulet, $\delta = 11,45$ ppm

H_6 , doublet, $\delta = 7,7$ ppm, $J_{6-5} = 8,2$ c/s

4 protons aromatiques, 2 "doublets" $\delta = 6,60$ ppm

H_1 , doublet, $\delta = 5,8$ ppm, $J_{1,2} = 3,7$ c/s

H_5 , doublet, $\delta = 5,65$ ppm, $J_{5,6} = 8,2$ c/s

Dérivé caractéristique : Para-acétamidophényl-0-5' uridine X

On dissout 0,350 g (10^{-3} mole) de l'amine ci-dessus dans 10 ml d'eau et 10 ml de méthanol. On ajoute 2,5 ml d'anhydride acétique et abandonne une nuit à température ambiante. Le dérivé acétylé qui cristallise est refroidi à 0° avant filtration, lavé à l'eau et séché sous vide (0,300 g - 7%). $F = 230^\circ$. Ce point de fusion est inchangé par mélange avec un échantillon authentique de para-acétamidophényl-0-5' uridine préparé plus loin par synthèse directe ($F = 230^\circ$).

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

Le spectre est rigoureusement superposable en tous points à celui d'un échantillon authentique préparé par synthèse directe.

Condensation de la para-aminophényl-0-5' uridine sur la sérum albumine bovine

On dissout dans 5 ml d'eau 0,1 D g ($5 \cdot 10^{-4}$ mole) de para-aminophényl-0-5' uridine à l'aide de 1,5 ml de HCl N. La solution est refroidie à 0° puis additionnée goutte à goutte de 35 mg ($5 \cdot 10^{-4}$ mole) de nitrite de sodium dans le minimum d'eau et abandonnée 10 minutes à 0°. Cette solution est ensuite versée goutte à goutte dans 10 ML d'une solution aqueuse, également refroidie à 0°, de sérum albumine bovine (0,500 g) et agitée magnétiquement. Le pH est maintenu entre 8 et 9 tout au long de l'addition (15 mn), par addition de K_2CO_3 en solution aqueuse. La solution est ensuite maintenue à ce pH et à 0° pendant 45 minutes après l'addition du sel de diazonium,

après quoi le pH est ramené à 7 par HCl dilué et la solution est dialysée à 4° pendant 4 jours contre de l'eau distillée (4 x 12 l) avant d'être lyophilisée.

Détermination du nombre de groupements fixés :

100 mg de la protéine lyophilisée sont chauffés à reflux pendant 6 heures dans 20 ml de HCl 6N. La solution est évaporée à sec à température ambiante à l'aide d'une pompe à palettes et d'un piège à air liquide et le résidu, dissout dans le minimum d'eau, est déposé sur papier whatmann n°3 MM et chromatographié dans le système butanol-CH₃COOH-H₂O (50 : 25 : 25) (chromatographie ascendante). La bande correspondant à l'uracile ($R_F \approx 0,55$) est découpée et éluee par 250 ml de tampon phosphate pH = 7. Le spectre U.V. présente un maximum à 258 nm : $d = 1,33$, soit une concentration en uracile de $1,6 \cdot 10^{-4}$ M/l (λ_{max} uracile = 259 nm, $\epsilon = 8.300$ à pH = 7). Nous avons donc fixé précédemment $0,40 \cdot 10^{-4}$ mole d'uridine sur 100 mg de protéine soit un minimum de 24 groupements par mole.

Para-acétamidophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' uridine VII

3,490 g de tosylisopropylidène uridine ($7,96 \cdot 10^{-3}$ mole), 5,501 g de para-acétamidophénate de sodium ($3,18 \cdot 10^{-2}$ mole - 4 équiv.) et 1,201 g (7, $7,96 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-acétamidophénol sont chauffés à reflux pendant 6 heures à l'abri de l'humidité dans 100 ml de DMF fraîchement distillé. On évapore à sec en rajoutant de l'eau et la gomme noire résiduelle est mélangée avec du gel de silice et le tout déposé au sommet d'une colonne de gel de silice faite dans le chloroforme ($\phi = 4$ cm, $H = 85$ cm. SiO₂ mallinckrodt n° 7.083. 100-200 mesh CC+ 7). Les fractions sont recueillies et analysées avec notre dispositif usuel. La colonne a été éluee successivement par le chloroforme (1 l.) le mélange CHCl₃-EtOH (95 : 5) (1,7 l.), CHCl₃-EtOH (9 : 1) (1,3 l.) et CHCl₃-MeOH (8 : 2) (1,5 l.). Le produit attendu est élué par le dernier éluant et sort juste avant le para-acétamidophénol qui est facilement caractérisable. On obtient ainsi 1,680 g ($4,02 \cdot 10^{-3}$ mole - 50%) d'une gomme pure sur plaque et que nous n'avons pas pu recristalliser.

Chromatographie : couche mince de gel de silice fluorescent - $R_F \neq 0,56$ (CHCl₃ - EtOH (8 : 2)).

Para-acétamidophényl-0-5' uridine X

La gomme précédente (1,680 g) est chauffée 1 h 30 à 100° dans 50 ml de CH₃COOH à 33% et le tout est évaporé à sec en rajoutant plusieurs fois de l'eau. Le solide blanc résiduel a été recristallisé dans l'eau ou le méthanol (1,000 g - 2,7.10⁻³ mole - 67% ou 34% sur la base du tosylate de départ). F = 230-231°.

Analyse : C₁₇H₁₉N₃O₇ = 377,35

Calculé % :	C : 54,11	H : 5,08	N : 11,14
Trouvé % :	53,8	5,12	10,94
	53,51	5,14	10,98

Spectre ultra-violet (C = 4,5.10⁻⁵ M/l dans CH₃OH)

λ_{min} 223 nm ε = 7.500, λ_{max} 251 nm ε = 23.400

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.480 cm⁻¹ (OH), 3.430 cm⁻¹ (NH amide), 1.700 et 1.680 cm⁻¹ (C=O uracil), 1.640 cm⁻¹ (C=O amide), 1.640 cm⁻¹ (NH et C-N amide, bande II), 1.280 cm⁻¹ (éther aromatique), 1.090, 1.055 et 1.040 cm⁻¹ (C-O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire DMSO-d₆, 60 MC; T.M.S. réf. interne).

NH en 3, singulet, δ = 11,40 ppm

NH amide aromatique, singulet, δ = 9,88 ppm

H₆, doublet, δ = 7,8 ppm, J_{6,5} = 8,2 c/s

2 protons aromatiques, δ = 7,52 ppm, J = 8,2 c/s

2 protons aromatiques (2" et 6"), δ = 6,95 ppm, J = 8,2 c/s

H₁ et H₅, massif centré à δ = 5,72 ppm, J_{1,2} ≈ 3,7 c/s et J_{5,6} = 8,2 c/s

OH₂, OH₃ et H₄, massif, δ = 4,8 ppm

H₂, H₃, 2 H₅, massif, δ = 4,18 ppm

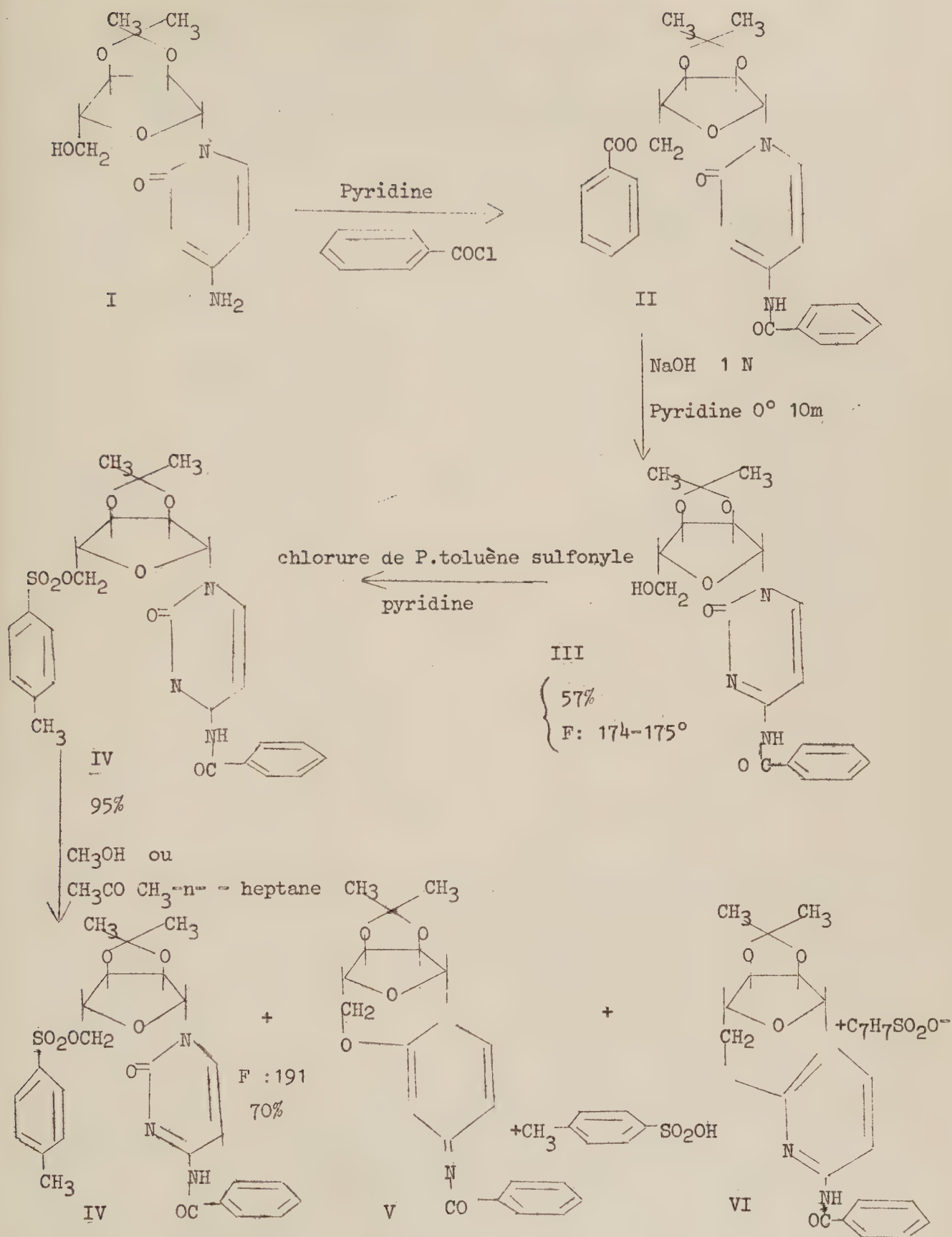
CH₃ acétyl, singulet, δ = 2,05 ppm.

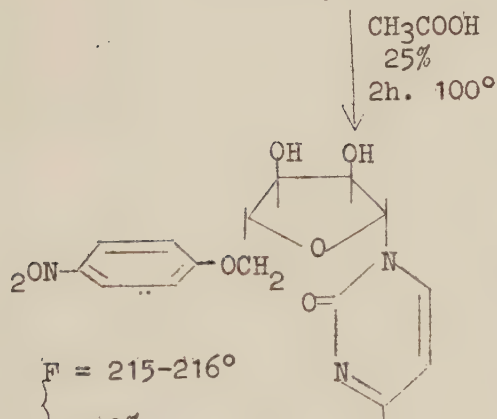
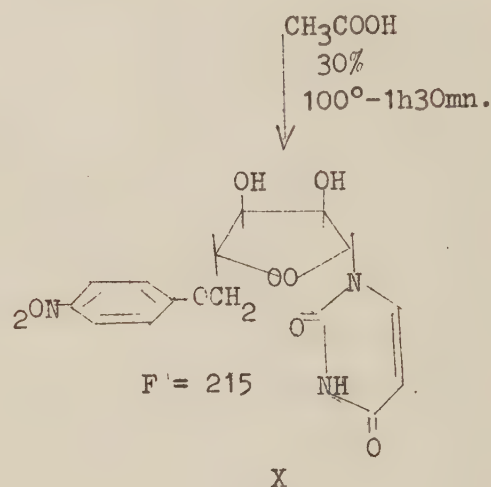
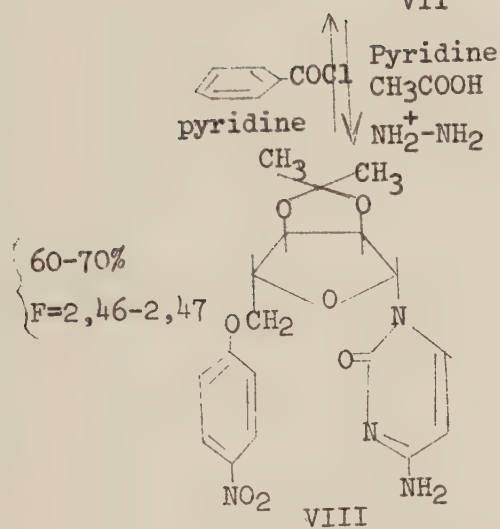
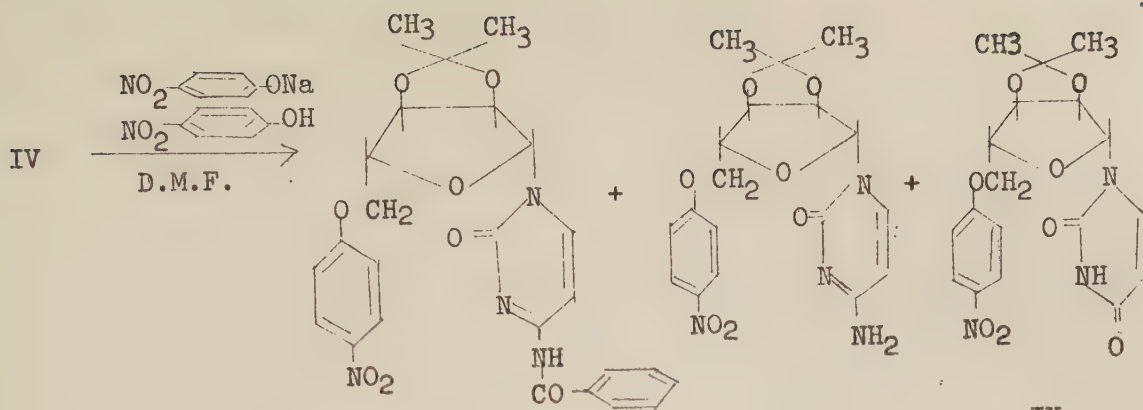
Para-acétamido phénol IV

A été préparé en dissolvant 200 g de para-aminophénol dans 250 ml d'eau et 250 ml de méthanol. On ajoute 100 ml d'anhydride acétique, abandonne une nuit à température ambiante et évapore à sec. Le solide résiduel a été recristallisé deux fois dans un mélange eau-alcool après décoloration par du charbon activé (85-90%). F = 118° (littérature : F = 118°)

Spectre ultra-violet (C = 1,2.10⁻⁴ M/l dans CH₃OH)

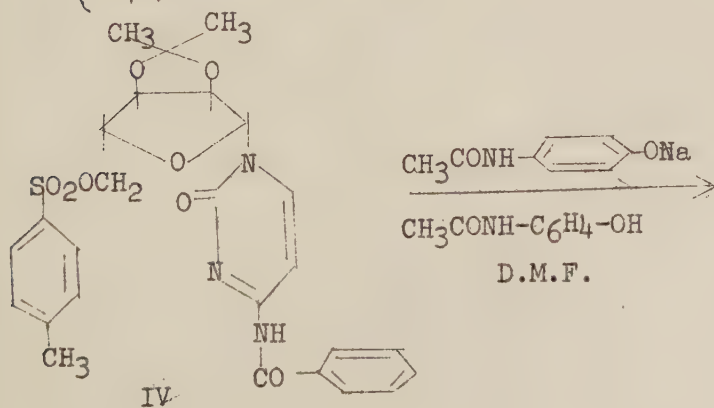
λ_{max} 248 nm ε = 12.770, épaulement autour de 282 nm ε = 2.060





$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
 ou
 H_2 et Ni de Raney

destruction de la molécule



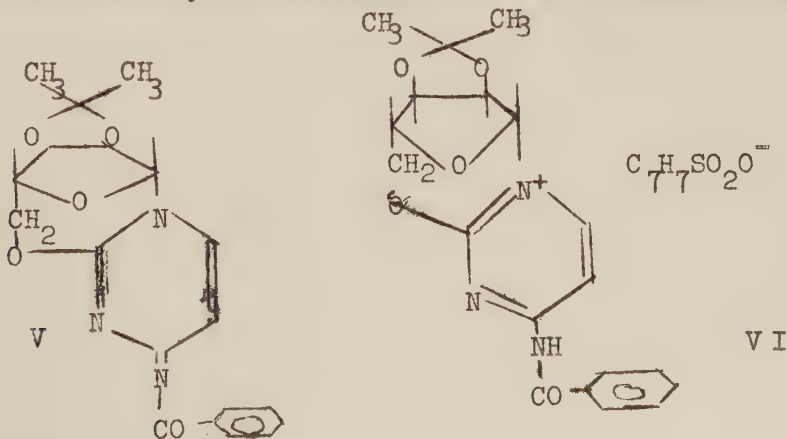
C H A P I T R E II

=====

Para-nitrophényl-0-5' cytidine

Nous avons préparé la para-nitrophényl-0-5' cytidine selon notre méthode usuelle en substituant le tosylate en 5' de la cytidine convenablement protégée par la para-nitrophénate de sodium dans la diméthylformamide. La fonction amine en position 4 de la cytosine a été protégée par un groupement benzoyle et les deux hydroxyles en 2' et 3' par un groupement isopropylidène.

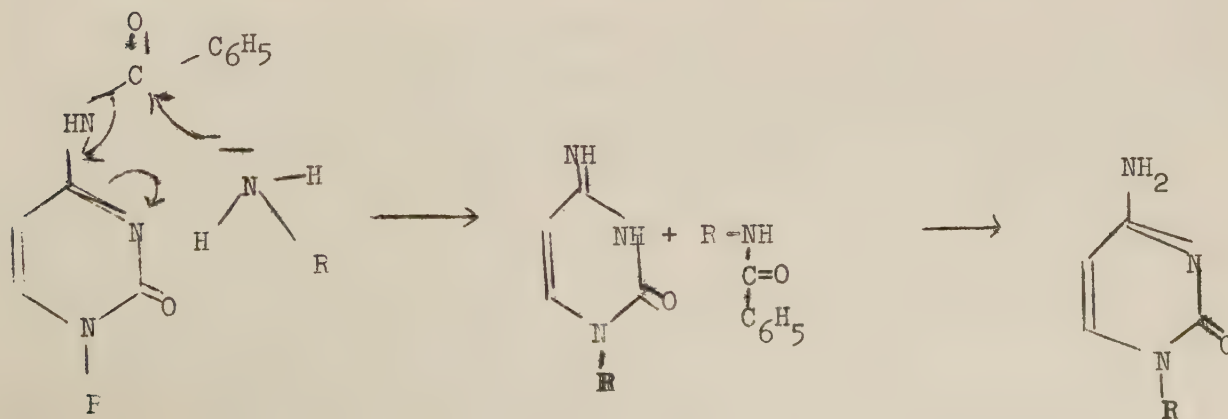
Le traitement de l'isopropylidène-0-2',3' cytidine I (22, 24) par le chlorure de benzoyle dans la pyridine donne intermédiairement le dibenzoate correspondant II qui n'est pas isolé et qui, traité directement à 0° pendant 10 minutes par le mélange pyridine-NaOH 1N (1 : 1), donne directement la benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine III par débenzoylation sélective sur l'oxygène. Cette méthode avait déjà été utilisée par Chladek et Smit pour préparer le dérivé correspondant de l'adénosine (23). Dans notre cas, le N-benzoate III a été obtenu avec un rendement voisin de 60% après recristallisation. Le traitement de III par le chlorure de para-toluène sulfonyle dans la pyridine donne, après une élaboration classique et sans recristallisation, la para-toluène sulfonyl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine IV avec un rendement de 95%. Ce tosylate pratiquement pur sur couche mince de gel de silice ($R_F = 0,80$ - CHCl_3 - EtOH (9 : 1)) est susceptible d'être utilisé tel quel pour une réaction ultérieure. Ce tosylate peut être recristallisé soit dans le méthanol, soit dans l'acétone, mais on constate alors que cette recristallisation a un faible rendement malgré le peu de solubilité de ce tosylate dans ces deux solvants. Si l'ébullition nécessaire à la dissolution est trop longue, le rendement en produit cristallin peut être nettement inférieur à 50%, et la chromatographie des eaux mères sur gel de silice (CHCl_3 - EtOH (95 : 5)) montre l'apparition de nouveaux constituants qui correspondent probablement au cation et à l'anion du tosylate ionique VI ou à l'anhydro nucléoside V



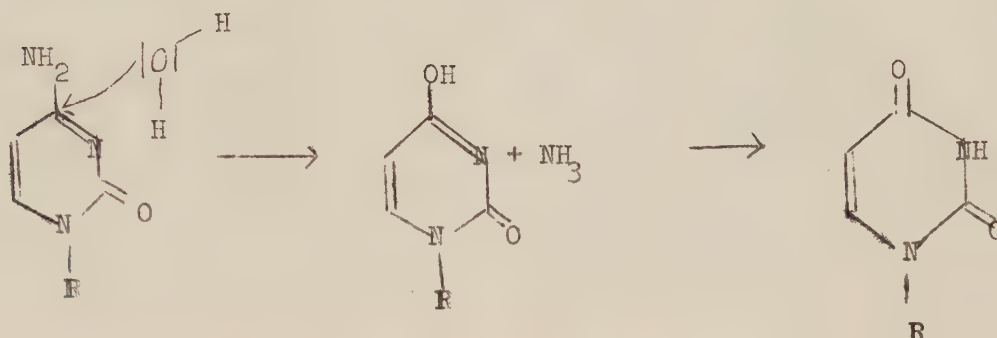
Ceci constitue encore un exemple d'attaque nucléophile intramoléculaire de l'oxygène en 2 de la base sur des esters en 5' du sucre ainsi que nous l'avons signalé dans la première partie pour les benzoates et diméthyl-2",6" benzoates de thymidine et uridine.

Un comportement analogue a été reporté par A. F. Todd (25) pour la tosyl-0-5' isopropylidène cytidine, préparée directement avec un très faible rendement à partir d'isopropylidène cytidine, et qui n'a pu être obtenue que mélangée avec le tosylate ionique correspondant. Le chauffage à 100° dans l'acétone de ce mélange a donné un rendement quantitatif en tosylate ionique. D'autre part, P. M. Fromageot et C. B. Reese (26) ont également montré que différents tosylates ou mésylates de cytidine se convertissent très aisément en anhydrocytidines correspondantes. Quoiqu'il en soit le tosylate isolé IV, brut ou cristallin, correspond au tosylate covalent et les données spectrales U.V. et de R.M.N. le confirment. D'ailleurs ce tosylate ne donne qu'une seule tache par chromatographie ce qui exclut d'emblée la structure ionique VI, quand un produit V^{co} n'est pas un tosylate.

Le traitement de IV par la para-nitrophénate de sodium en présence de para-nitrophénol dans la D.M.F. à reflux nous a donné, comme attendu, la para-nitrophényl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine VII. Il est fort probable que l'anhydro nucléoside V est un intermédiaire de la réaction, ce qui justifie ici plus qu'ailleurs la présence de para-nitrophénol dans le milieu réactionnel. Ce para-nitrophényl éther VII attendu est accompagné de para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' uridine IX et de para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' cytidine VIII. Nous avons constaté que les proportions des trois constituants essentiels du mélange étaient variables d'une réaction à l'autre. Le dérivé débenzoylé sur l'azote VIII est en général largement prépondérant et on peut penser qu'il se forme pendant le reflux dans la D.M.F. par attaque du dérivé N-benzoylé VII par des amines R-NH₂ présentes dans le solvant (probablement de la méthyl ou di-méthyl amine). La réaction débiterait par une attaque nucléophile de l'azote de l'amine sur le carbonyle du groupement benzoyle selon le schéma suivant :



La deuxième étape serait l'élimination de l'amide benzoïque et le transfert d'un proton de cette dernière à la cytosine, étape dont l'énergie d'activation est faible pour la cytidine. La forme imine n'existant pas pour la cytidine⁽²⁷⁾, le réarrangement en forme amino est immédiat. Quant à la formation de la para-nitrophényl-0-5' uridine IX, elle procéderait par attaque nucléophile de molécules d'eau sur la cytidine débenzoyle V III :



Cette réaction serait susceptible de se produire si le DMF. n'est pas rigoureusement anhydre, ce qui est peu probable, soit lorsque nous ajoutons de l'eau pour terminer la réaction et évaporer à sec. Effectivement nous avons vérifié qu'en l'absence totale d'eau, même pendant l'évaporation à sec, la para-nitrophényl-0-5' uridine IX n'existait qu'à l'état de traces infimes. Nous décrirons ici la réaction en évaporant à sec en présence d'eau, étant entendu que la présence ou l'absence d'uridine ne modifie en rien les techniques de purification utilisées.

Enfin, la para-nitrophényl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène cytidine V II restée intacte dans le mélange réactionnel a été débenzoylée par le réactif hydrate d'hydrazine 0,5 M dans pyridine - CH_3COOH (4 : 1) mis au point par Letsinger, Miller et Grams (20). Le rendement en para-nitrophényl éther attendu V III oscille entre 60 et 70%. Quant au para-nitrophényl éther de l'uridine IX il peut osciller entre 1 et 15%.

La structure de tous les produits a été confirmée par leurs spectres U V. et R.M.N. De plus, un échantillon du para-nitrophényl éther debenzoylé de la cytidine V III a été traité par le chlorure de benzoyle pour donner V II non isolé jusqu'ici et étudié par R.M.N.

Enfin, les groupements protecteurs isopropylidènes ont été éliminés dans le cas de l'uridine et de la cytidine par l'acide acétique aqueux à 100° pour donner les deux para-nitrophényl éthers X et XI. La para-

nitrophényl-0-5' uridine X préparée ici s'est révélée être identique à celle préparée directement comme indiqué au chapitre précédent (R_F mélange = 215, même R_F en chromatographie, spectres U.V. identiques).

Il ne nous a pas été possible de réduire la para-nitrophényl-0-5' cytidine XI pour obtenir l'amine correspondante. La réduction, par l'hydrosulfite de sodium dans l'eau, conduit à un mélange de produits fort complexes et serait donc à proscrire ; dans l'état actuel des choses nous n'avons pas encore trouvé de réduction catalytique utilisable. Etant donné cet échec, nous avons voulu reproduire dans le cas de la cytidine la substitution directe du groupement tosyl par le para-acétamidophénate de sodium, mis au point pour l'uridine. Cette fois la réaction n'a pas donné le produit attendu mais une infinité de substances non identifiées avec des rendements quasi nuls pour chacune d'elles.

o

o

o

Partie Expérimentale

Benzoyl-N-4 isopropylidène-O-2',3' cytidine III

On dissout 5,04 g ($1,64 \cdot 10^{-2}$ mole) d'isopropylidène cytidine dans 67 ml de pyridine anhydre fraîchement distillée sur potasse et ajoute 3,6 ml de chlorure de benzoyle. La solution est agitée magnétiquement pendant 90 minutes à l'abri de la lumière et de l'humidité, puis versée goutte à goutte dans 600 ml d'eau et de glace. On extrait plusieurs fois avec du chloroforme (3 x 100 ml). Les extraits chloroformiques sont ensuite lavés avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 , à l'eau, séchés sur Na_2SO_4 et enfin évaporés à sec. On obtient ainsi une gomme brun-rouge qui est le dibenzoate II. Ce résidu est dissous dans 212 ml de pyridine. On refroidi à 0° et ajoute 212 ml de soude 1 N également à 0° . Le mélange réactionnel est maintenu à cette température pendant 10 minutes tout en agitant de temps à autre. On neutralise ensuite par 21,2 ml d'acide acétique glacial et évapore à sec sous vide à $t < 35^\circ$. Le solide obtenu est mis en suspension dans l'eau (300 ml) et extrait plusieurs fois par du chloroforme (3 x 100 ml). Ces extraits chloroformiques traités comme précédemment sont évaporés à sec et séchés sous vide. On obtient ainsi 4,450g ($1,15 \cdot 10^{-2}$ mole = 70%) de benzoyl-N-4-isopropylidène-O-2',3' cytidine. Ce solide a été recristallisé par dissolution dans le volume minimum d'acétone (250 ml à reflux) en concentrant ensuite la solution (environ 150 ml) et en rajoutant ensuite à l'ébullition du n-heptane jusqu'à la limite d'obtention d'un trouble persistant. De fines aiguilles blanches apparaissent au refroidissement. La cristallisation est achevée en refroidissant à 0° (3,6 g = $9,30 \cdot 10^{-3}$ mole = 57%) $F = 174-175^\circ$. L'échantillon analytique a été recristallisé une deuxième fois dans les mêmes conditions et fondait à 182° .

Analyse : $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6 = 387$

Calculé % : C : 58,91

H : 5,42

N : 10,85

Trouvé % : 58,8

5,41

10,69

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.310 cm^{-1} (OH), 3.480 cm^{-1} (NH amide), 1.710 cm^{-1} (C=O cytosine), 1.660 et 1.620 cm^{-1} (C=O amide, bande I), 1.550 cm^{-1} (NH et CN amide (bande II), 1.090 , 1.070 et 1.050 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre ultra-violet ($C = 3,7 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{min} 230 nm $\epsilon = 9.650$, λ_{max} 260 nm $\epsilon = 23.860$; λ_{min} 286 nm $\epsilon = 8.310$,
 λ_{max} 304 nm $\epsilon = 9.920$

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 Mc, TMS ref.interne)

NH en 4, singulet, $\delta = 11,35$ ppm

H_6 , doublet, $\delta = 8,35$ ppm, $J_{6,5} = 7,5$ c/s

3 protons aromatiques, massif, $\delta = 8,08$ ppm

2 protons aromatiques (2" et 6"), $\delta = 7,58$ ppm, $J_{2''3''} = J_{6''5''} = 6$ c/s

H_5 , doublet, $\delta = 7,38$ ppm, $J_{5-6} = 7,5$ c/s

H_1 , $\delta = 5,92$ ppm

OH_5 , triplet, $\delta = 5,18$ ppm, $J = 4,2$ c/s

H_2 , et H_3 , massif, $\delta \neq 4,90$ ppm

H_4 , massif, $\delta = 4,28$ ppm, $J_{4,3} = 6,3$ c/s et $J_{4,5} = 3,7$ c/s

$2H_5$, $\delta = 3,70$ ppm, $J_{5,4} = 3,7$ c/s

2 CH_3 isopropylidène, 2 singulets à $\delta = 1,52$ et $1,32$ ppm.

Para-toluène sulfonyl-O-5'benzoyl-N-4 isopropylidène-O-2',3' cytidine IV

1,000 g ($2,6 \cdot 10^{-3}$ mole) du N-benzoate précédent et 0,536 g (1,1 équivalent) de chlorure de para-toluène sulfonyle sont dissous dans 10 ml de pyridine anhydre et la solution est abandonnée une nuit à température ambiante. Cette dernière est ensuite versée goutte à goutte dans 150 ml d'eau glacée magnétiquement agitée et on extrait par du chloroforme (3 x 60 ml). La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$, à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec à $t < 35^\circ$. On obtient ainsi 1,366 g ($2,5 \cdot 10^{-3}$ mole = 95%) d'un solide blanc pratiquement pur sur couche mince de gel de silice et qui est le tosylate IV. Sa recristallisation rapide dans l'acétone additionnée de n-heptane ou la méthanol donne 0,999 g de cristaux ($1,85 \cdot 10^{-3}$ mole = 71%). $F = 188-190^\circ$. L'échantillon analytique a été recristallisé une deuxième fois dans le méthanol. $F = 191^\circ$.

Chromatographie : couche mince de gel de silice fluorescent Prolabo.

Phase mobile : $CHCl_3$ - EtOH (90 : 10) 1 seule tache $R_F = 0,84$

$CHCl_3$ - EtOH (95 : 5) 1 seule tache $R_F = 0,48$

Analyse : $C_{26}H_{27}N_3O_8S = 541,5$

Calculé % : C : 57,67

H : 5,08

N : 7,76

Trouvé % : 57,64

4,86

7,66

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.340 cm^{-1} (NH amide), 1.695 cm^{-1} (C=O cytosine), 1.660 et 1.640 cm^{-1} (C=O amide, bande I), 1.550 cm^{-1} (NH et CN amide, bande II), 1.185 cm^{-1} (S=O sulfonate).

Spectre ultra-violet (C = $5,30 \cdot 10^{-5}$ mole/l dans CH_3OH)

λ_{max} 223 nm $\epsilon = 20.670$, λ_{min} 238 nm $\epsilon = 13.300$, λ_{max} 260 nm $\epsilon = 26.100$,
 λ_{min} 290 nm $\epsilon = 8.450$, λ_{max} 302 nm $\epsilon = 9.210$.

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 Mc, T.M.S. ref. int.)

NH en 4, $\delta = 11,45$ ppm

H_6 , doublet partiellement recouvert par les protons aromatiques,

$$\delta = 8,12 \text{ ppm}, J_{6,5} = 7,5 \text{ c/s}$$

9 protons aromatiques, multiplets autour de $\delta = 7,7$ ppm

H_5 doublet partiellement recouvert par les protons aromatiques,

$$\delta = 7,32 \text{ ppm}, J_{5,6} = 7,5 \text{ c/s}$$

H_1 , $\delta = 5,80$ ppm

H_2 , et H_3 , deux multiplets à $\delta = 5,12$ et $4,82$ ppm

2 H_5 , et H_4 , massif, $\delta = 4,48$ ppm

CH_3 aromatique, singulet, $\delta = 2,38$ ppm

2 CH_3 isopropylidène à $\delta = 1,48$ et $1,28$ ppm.

Para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' cytidine VIII et para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' uridine IX

2,474g ($4,57 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-toluènesulfonyl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine I, 0,635 g ($4,57 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrophénol et 2,543g ($1,61 \cdot 10^{-2}$ mole, 4 équivalents) de para-nitrophénate de sodium rigoureusement anhydres sont chauffés pendant 5 heures à 110° à l'abri de l'humidité dans 40 ml de D.M.F. fraîchement distillé sur P_2O_5 . On évapore à sec ($50-60^\circ$) en rajoutant plusieurs fois de l'eau. Le solide jaune obtenu est dissout dans le chloroforme (250 ml) et la phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution aqueuse saturée en KHCO_3 (4 x 250 ml), à l'eau (3 x 250 ml), séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. On obtient 2,320 g d'une mousse rougeâtre dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice Prolabo ($\text{CH}_3\text{COOEt} - \text{EtOH}$ (90 : 10) phase mobile) indique six constituants dont les R_F approximatifs sont les suivants :

$R_F = 0$, non identifié

$R_F = 0,18$, para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' cytidine

$R_F = 0,57$, probablement un dérivé de l'acide para-toluènesulfonique.

$R_F = 0,80$, para-nitrophényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' uridine

$R_F = 0,84$, para-nitrophényl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine

$R_F = 0,90$, produit de départ. Traces.

Cette mousse est dissoute dans un peu d'acétate d'éthyle, refroidie à température ambiante et abandonnée 24 heures à 0°. Les cristaux (0,800 g) de para-nitrophényl-0-5' isopropylidène cytidine VIII sont filtrés et le filtrat évaporé à sec (1,450 g). Le résidu est dissout dans 30 ml de pyridine - CH_3COOH (4 : 1), on ajoute 1 ml d'hydrate d'hydrazine et abandonne 24 heures à température ambiante. La solution est versée dans 250 ml d'eau, extraite au chloroforme et les extraits chloroformiques évaporés à sec. La mousse résiduelle est dissoute dans le volume minimum de CH_3COOEt (si des cristaux de VIII apparaissent, on les filtre) et la solution déposée au sommet d'une colonne de gel de silice (Mallinckrodt n° 2.847. 100 mesh $\varnothing = 3$ cm, $H = 50$ cm dans CH_3COOEt). L'élution de la colonne par le mélange CH_3COOEt - EtOH (95 : 5), et en recueillant les fractions (15 ml) avec notre dispositif usuel, permet d'isoler en premier lieu la para-nitrophényl isopropylidène uridine IX (0,260 g, $0,64 \cdot 10^{-3}$ mole - 14 %) et finalement la para-nitrophényl isopropylidène cytidine VIII (0,430 g), ce qui porte le poids total à 1,230 g ($3,0 \cdot 10^{-3}$ mole - 65%). L'échantillon analytique a été recristallisé dans le volume minimum d'alcool absolu. $F = 246-247^\circ$.

Analyse : $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_7 = 404,37$

Calculé %	C : 53,46	H : 4,99	N : 13,86
Trouvé %	53,32	4,87	13,70

Spectre ultra-violet ($C = 6 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

$\lambda_{\text{max}} 227 \text{ nm}$ $\epsilon = 14.830$, $\lambda_{\text{min}} 250 \text{ nm}$ $\epsilon = 8.650$, $\lambda_{\text{max}} 276 \text{ nm}$ $\epsilon = 13.000$,
 $\lambda_{\text{min}} 298 \text{ nm}$ $\epsilon = 11.330$, $\lambda_{\text{max}} 308 \text{ nm}$ $\epsilon = 11.600$.

Para-nitrophényl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine VII

0,200 g du para-nitrophényl éther précédent VIII ($3,9 \cdot 10^{-4}$ mole) et 0,1 ml de chlorure de benzoyle sont dissouts dans 3 ml de pyridine anhydre et abandonnés 16 heures à température ambiante, à l'abri de l'humidité. Cette solution est ensuite versée dans 50 ml d'eau saturée en KHCO_3 avant d'extraire par du chloroforme. Après le traitement usuel des extraits chloroformiques et évaporation à sec, le résidu est déposé et chromatographié sur plaque épaisse de gel de silice (5 mm - 20 x 20 cm) en utilisant le mélange CH_3COOEt - EtOH (95 : 5) comme éluant. La bande convenable est découpée et éluee par du méthanol. Après évaporation à sec, le résidu est repris par le chloroforme, filtré et réévaporé à sec. Le solide obtenu (0,200 g) n'a pu être recristallisé et était chromatographiquement pur.

Chromatographie : couche mince de gel de silice Prolabo - $R_F = 0,84$
($\text{CH}_3\text{-COOEt-EtOH}$ (90 : 10))

Spectre ultra-violet ($C = 2,9 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 226 nm $\epsilon = 16.550$, λ_{min} 237 nm $\epsilon = 14.100$, λ_{max} 261 nm $\epsilon = 25.170$,
 λ_{min} 282 nm $\epsilon = 15.500$, λ_{max} 302 nm $\epsilon = 18.700$.

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO-d_6 , 60 MC, TMS réf. interne)

NH en 4, singulet, $\delta = 11,38$ ppm

2 protons aromatiques (nitrophényl éther) $J = 9$ c/s)
 H_6 et 3 protons aromatiques (benzoyl)) massif, $\delta \approx 8,22$ ppm

2 protons aromatiques (benzoyl), massif, $\delta = 7,55$ ppm, $J = 6$ c/s

2 protons aromatiques (nitrophényl éther), $J = 9$ c/s)
 H_5 , $J_{5,6} = 7,2$ c/s) massif, $\delta \approx 7,25$ ppm

H_1 , , non résolu, $\delta = 6,0$ c/s

H_4 , et $\text{H}_{2,}$, massif, $\delta = 5,15$ c/s, $J_{4,5,} = 6$ c/s

H_3 , et 2 $\text{H}_{5,}$, massif non résolu, $\delta = 4,55$ ppm

2 CH_3 isopropylidène à $\delta = 1,58$ et $1,38$ c/s

Para-nitrophényl-0-5' cytidine XI

On chauffe à 100° , pendant 1 h 30, 0,400 g (10^{-3} mole) de para-nitro-phényl-0-5' isopropylidène-0-2',3' cytidine VIII dans 30 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 30% et évapore ensuite à sec en rajoutant plusieurs fois de l'eau. Le solide obtenu a été recristallisé avec difficulté dans un mélange alcool-eau ou l'eau pure (0,260g = 71 %) ou encore purifié sur couche épaisse de gel de silice (0,5 cm - 20×20 cm - $\text{CH}_3\text{COOEt} - \text{MeOH}$ (8 : 2)) avec cependant un rendement inférieur (50%) - $F = 215-216^\circ$.

Chromatographie : couche mince de gel de silice - $R_F = 0,18$ ($\text{CHCl}_3 - \text{EtOH}$ (8 : 2) - Papier Whatmann n°3MM, $R_F = 0,67$ (isopropanol- $\text{NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}$) (7 : 1 : 2))

Analyse : $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7 = 364,3$

Calculé %	C : 49,45	H : 4,43	N : 15,38
Trouvé %	49,17	4,57	15,14

Spectre ultra-violet ($C = 0,8 \cdot 10^{-4}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 226 nm $\epsilon = 14.500$, λ_{min} 249 nm $\epsilon = 7.900$, λ_{max} 278 nm $\epsilon = 13.950$,
épaulement vers 300 nm $\epsilon = 11.560$.

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.440 et 3.220 cm^{-1} (OH, 1.660 cm^{-1} (C=O cytosine), 1.500, 1.350 et 840 cm^{-1} (NO_2 aromatique), 1.265 cm^{-1} (éther aromatique), 1.090, 1.065 et 1.040 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO-d₆, TMS ref. int., 60 MC)

2 protons aromatiques, $\delta = 8,28$ ppm, $J = 10,5$ c/s

H₆, doublet, $\delta = 7,65$ ppm, $J_{6,5} = 7,5$ c/s

2 protons aromatiques et 2 protons amine, massif, $\delta = 7,22$ ppm, $J_{\text{arom}} = 10,5$ c/s

H₁, et H₅, multiplet, $\delta = 5,75$ ppm, $J_{5,6} = 7,5$ c/s

OH₃, $\delta = 5,45$ ppm

OH₂, $\delta = 5,30$ ppm

H₄, et H₂, massif, $\delta = 4,30$ ppm

2 H₅, et H₃, massif non résolu, $\delta = 4,10$ ppm

Para-nitrophényl-O-5' uridine X

La para-nitrophényl-O-5' isopropylidène-O-2',3' uridine IX, isolée précédemment sur colonne de gel de silice, est traitée comme l'analogue correspondant de la cytidine en utilisant une solution aqueuse d'acide acétique à 33%. Le solide obtenu a été recristallisé dans l'eau. $F = 215-216^\circ$. Ce point de fusion est inchangé par mélange avec un échantillon de para-nitrophényl-O-5' uridine préparé à partir de tosyl-O-5' isopropylidène uridine.

Chromatographie : couche mince de gel de silice fluorescent. $R_F = 0,50$
(CHCl₃ - EtOH (80 : 20)).

Analyse : C₁₅H₁₅N₃O₈ = 365,28

Calculé % C : 49,32 H : 4,14 N : 11,50

Trouvé % 49,28 4,23 11,51

Spectre ultra-violet (C = 6,210⁻⁵ M/l dans CH₃OH)

$\lambda_{\text{min}} 240$ nm $\epsilon = 6.350$, $\lambda_{\text{max}} 266$ nm $\epsilon = 12.260$, $\lambda_{\text{min}} 286$ nm $\epsilon = 9.500$,
 $\lambda_{\text{max}} 302$ nm $\epsilon = 11.130$

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

Rigoureusement superposable à celui d'un échantillon authentique préparé à partir d'uridine

— — — — —

Troisième Partie
=====

Chapitre I

Para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose à partir de glucose

Chapitre II

Para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose

Chapitre III

Méthyl para-toluène sulfonyl-0-5 déoxy-2-D-riboside à partir de ribose.

Méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose

Chapitre IV

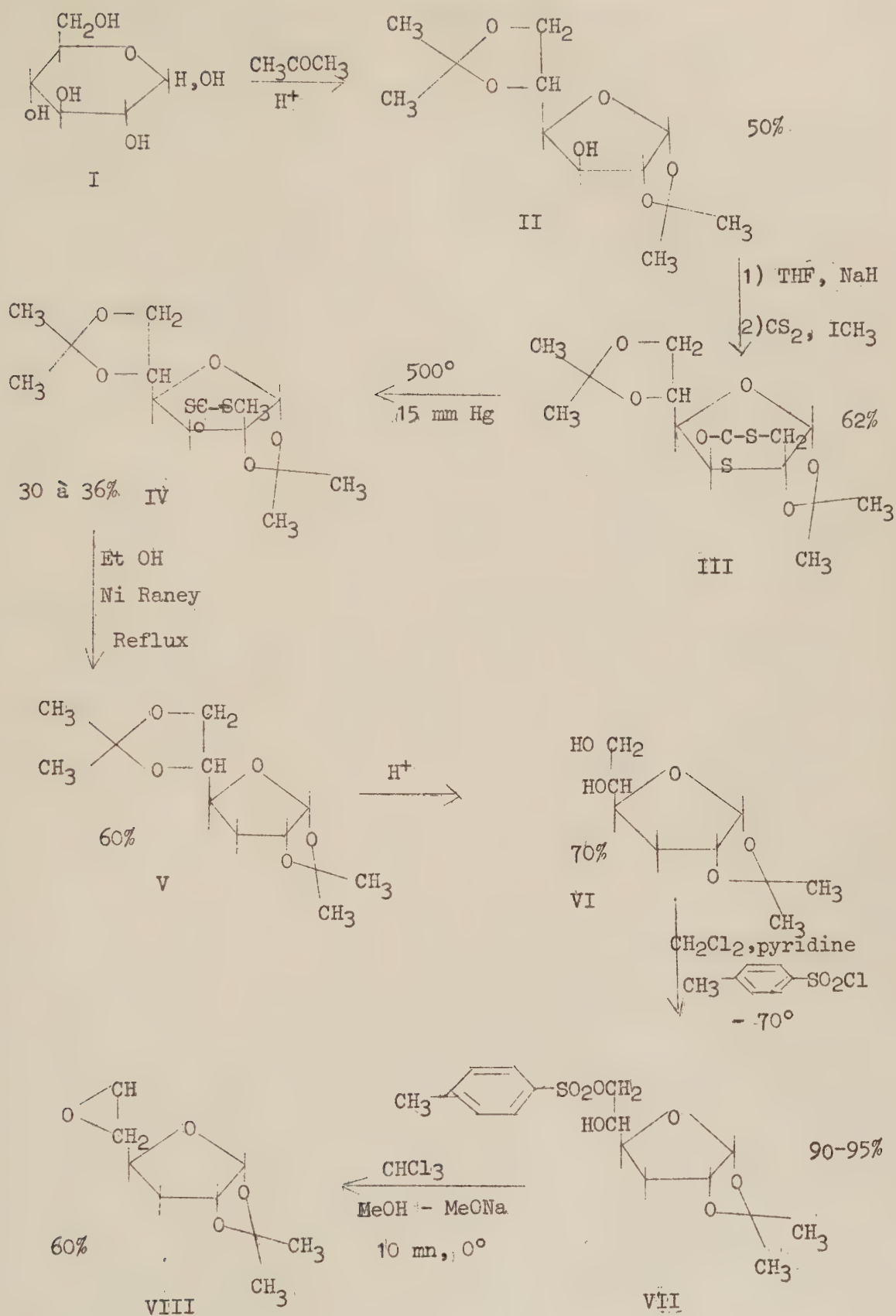
β -hydroxy éthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose à partir de β -hydroxy éthyl-0-6-D
glucose

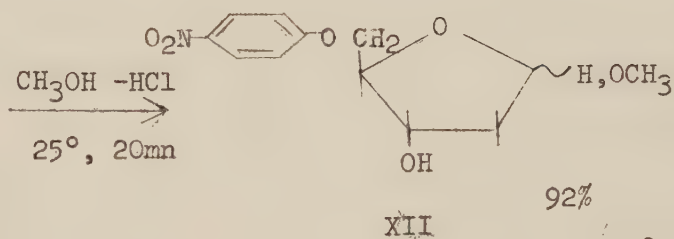
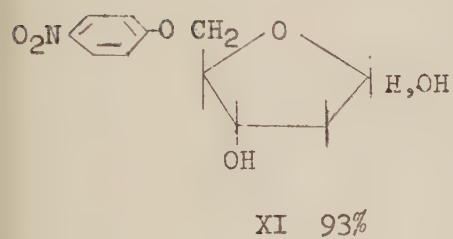
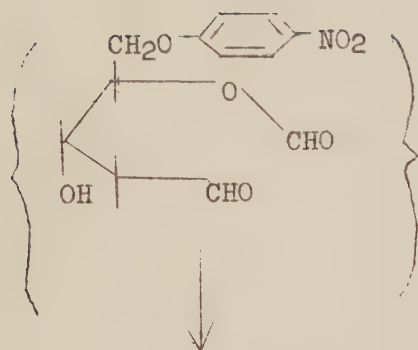
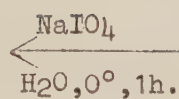
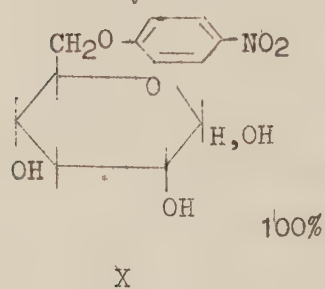
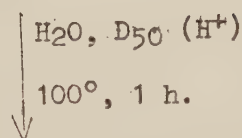
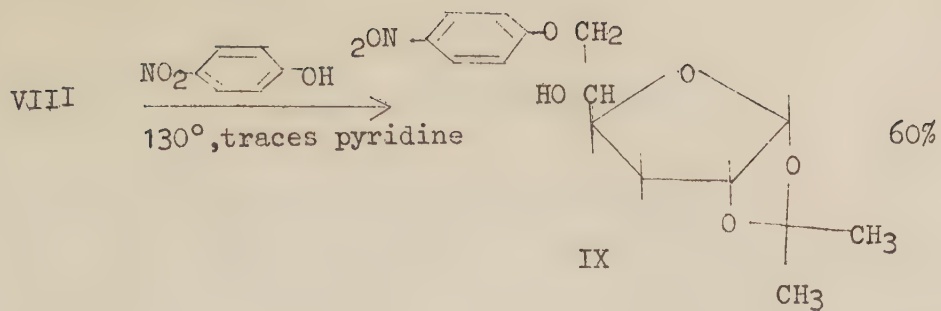
Chapitre V

β -hydroxy éthyl-0-5' déoxy-2'- α -adénosine

β -hydroxy éthyl-0-5' déoxy-2'- β -adénosine

Chapitre I - Schémas réactionnels





F = 70°

$\{\alpha\}_D^{26} = -47.5$

(C = 1.3 dans CHCl_3)

C H A P I T R E I

=====

Para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D ribose XI

Une synthèse du déoxy-2-D-ribose par oxydation du déoxy-3-D glucose parue dans "Nature" (28) avec un rendement acceptable, nous a laissé espérer un accès possible vers les dérivés substitués en 5 du déoxy-2 ribose à partir du dérivé convenable du déoxy-3 glucose. En effet, l'oxydation se fait par le métapériadate de sodium dans l'eau ce qui évite les dégradations alcalines préjudiciables à nos para-nitrophényl éthers de sucres (chapitre II).

Dès lors la préparation du para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D ribose XI pouvait se faire par oxydation périodique du para-nitrophényl-0-6 déoxy-3 glucose X. Cette réaction a été faite dans l'eau à une température voisine de 0° pendant 14 heures avec un équivalent de métapériadate de sodium. Après une élaboration classique suivie d'une chromatographie sur gel de silice, le déoxy-2 ribose XI a pu être obtenu avec un rendement voisin de 90%. Le para-nitrophényl-0-6 déoxy-3-D-glucose X, matière première pour cette oxydation, a été obtenu à partir du dérivé isopropylidène 1,2 correspondant IX par traitement dans l'eau à chaud par une résine échangeuse d'ion acide fort (Dowex-50, H⁺) avec un rendement quantitatif. Le para-nitrophényl-0-6 déoxy-3 isopropylidène-0-1,2- α -D-glucofuranose IX a été obtenu par attaque de l'anhydro-5,6 glucose VIII par le para-nitrophénol à 130° en présence de pyridine comme catalyseur. Cette réaction est une fusion ne nécessitant aucun solvant et dont le rendement est voisin de 60% en produit rigoureusement pur. Cette réaction avait déjà été utilisée par Heinz Ohle et Erich Euler en 1938 (29) pour préparer différents phényl éthers du glucose. Nous avons vérifié la structure du produit par les méthodes spectrales usuelles. Les spectres ultra-violet et infra-rouge indiquent clairement la présence d'un groupement para-nitrophényl dans la molécule. Le spectre de résonance magnétique nucléaire confirme que la substitution a bien eu lieu en position 6 et non 5. L'alcool secondaire en 5 donne un doublet confirmant la substitution de l'alcool primaire en 6.

Dès lors, cette synthèse revenait à préparer l'anhydro-5,6 déoxy-3 isopropylidène-0-1,2- α -D-glucofuranose VIII, produit déjà connu mais dont l'accès demeure assez délicat et le rendement très faible par rapport au glucose de départ, diminuant ainsi très fortement le rendement global de notre synthèse.

Le di-isopropylidène-0-1,2 : 5,6-D-glucofuranose II est aisément obtenu à partir du glucose avec un rendement de 50% en utilisant la préparation de Schmidt (30). Ce dernier a été transformé en di-isopropylidène-0-1,2 : 5,6 {thiocarbonyl (méthylthio) }-O-3-D-glucofuranose III avec un rendement pouvant atteindre 70% en modifiant légèrement la préparation proposée par Karl Freudenberg en 1927 (31) qui, utilisant l'éther comme solvant et la soude pour obtenir le sel de sodium de la fonction alcool du glucose avant traitement par le sulfure de carbone, obtenait un rendement plus faible (52%). Nous avons remplacé l'éther par le tétrahydrofurane et la soude par l'hydrure de sodium. La transposition du xanthogénate de méthyle III en di-isopropylidène-0-1,2 : 5,6 {(méthylthio) carbonyl} -S-3 thio-3-~~A~~-glucofuranose IV est l'étape la plus pénible de cette synthèse et dont le rendement est en général faible (30%). Différentes méthodes (31,32) ont été proposées, toutes consistant à chauffer plus ou moins fortement pendant des temps variables, avec ou sans solvant, le xanthogénate III pour distiller ensuite le résidu de cette transposition. Cette réaction a été finalement effectuée en nous inspirant de la préparation de Cerny et coll. (33). Le di-thiocarbonate IV traité à l'ébullition par le nickel de Raney dans l'alcool selon Cerny (34) donne le di-isopropylidène-0-1,2:5,6 déoxy-3-D-glucofuranose V dont l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique dans l'acétone (35) donne le mono-isopropylidène-0-1,2 VI dont le traitement par un équivalent de chlorure de para-toluène sulfonyle permet d'obtenir, avec un rendement quantitatif, le tosylate-0-6 VII (35). Ce tosylate traité par un équivalent de méthoxide de sodium (36) conduit à l'anhydro-5,6 déoxy-3 isopropylidène-0-1,2-D-glucofuranose VIII (35), produit de départ de notre synthèse, conduisant comme indiqué précédemment au para-nitrophényl-0-5-déoxy-2-D-ribose XI. Ce dérivé du déoxyribose n'a pu être recristallisé et a été transformé directement en son méthyl désoxy riboside XII incomparablement plus stable dans le temps. Nous donnons dans la partie expérimentale les spectres ultra-violet, infra-rouge et R.M.N. qui prouvent sans aucun doute que le produit a bien la structure attendue. D'autre part, le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{26} = -47.5$ (C = 1,300) dans CHCl_3) indiquerait qu'il serait essentiellement constitué par l'anomère β . En effet, un sucre de structure voisine comme le méthyl déoxy-2- β -D-ribo-hexofuranoside (37) a un pouvoir rotatoire comparable ($[\alpha]_D^{25} = 46^\circ$ (C 0,20, méthanol) alors que l'anomère α

correspondant à un pouvoir rotatoire de $+ 146^\circ$ dans le même solvant. Cependant, le spectre de résonance magnétique nucléaire de notre méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2 ribofuranoside donne un quadruplet pour le proton anomère ($\delta = 5,06$ ppm) avec des constantes de couplage : $J_{1,2} = 2,6$ c/s et $J_{1,2'} = 4,5$ c/s. Le pouvoir rotatoire n'étant pas caractéristique de la configuration du carbone anomérique c'est finalement sur la base de ce spectre de résonance magnétique nucléaire que nous attribuerons la configuration α à ce sucre, compte tenu du fait que l'anomère β aurait donné un triplet vers un champ légèrement plus faible. Enfin, un mélange des deux anomères (76) aurait dû nous donner un multiplet très étalé où devraient se retrouver les deux types de signaux précédents.



Partie Expérimentale

Di-isopropylidène-0-1,2:5,6 {thiocarbonyl (méthylthio)}-0-3-D-glucofuranose III (31)

On dissout 146 g (0,56 mole) de di-isopropylidène-0-1,2:5,6- α -D-glucofuranose II (30) dans 250 ml de T.H.F. anhydre. On ajoute à cette solution convenablement agitée 20,1 g (0,84 mole = 1,5 équiv.) d'hydruure de sodium et chauffe deux heures à reflux après que le dégagement d'hydrogène aie cessé. La solution est filtrée, refroidie à 0° et additionnée de 150 ml de sulfure de carbone également refroidi à 0°. Après avoir laissé reposer une nuit à température ambiante, on concentre sous vide jusqu'à l'obtention d'un sirop visqueux, ajoute 86 g (0,6 mole) d'iodure de méthyle et agite 24 heures à température ambiante. L'iodure de sodium qui a précipité, est ensuite filtré et lavé avec du T.H.F. Le filtrat et les eaux de lavage combinés sont évaporés à sec pour obtenir une huile noire qui est distillée. Eb 0,5 = 14°-150° (125 - 140 g = 0,35 - 0,39 mole = 62 à 71%). L'huile jaune obtenue cristallise au bout de quelques jours par trituration dans l'éther de pétrole. F = 61°.

Di-isopropylidène-0-1,2:5,6 {carbonyl(méthyl thio)}-S-3 thio-3- α -D-glucofuranose IV (33)

125 g de xanthogénate précédent sont placés dans une ampoule à décanter et maintenus à l'état fondu en chauffant à l'aide d'une lampe à infrarouge, de telle sorte que le liquide puisse librement couler dans un tube en pyrex rempli de pierre ponce et chauffé autour de 500° à l'aide d'un four électrique. Ce tube se termine par une allonge rôdée reliée à une fiole à vide plongeant dans un bain de glace. L'ensemble du système est soumis au vide d'une trompe à eau. Temps de passage de la totalité du liquide dans le four : 40 - 50 minutes. On recueille ainsi dans la fiole une huile brune qui ne tarde pas à se solidifier et qui a été recristallisée dans l'alcool absolu (45 g = 36%) - F = 135-142°.

Para-nitrophényl-0-5 déoxy-3 isopropylidène-0-1,2- α -D-glucofuranose IX

5,393 g ($2,95 \cdot 10^{-2}$ mole) d'anhydro-5,6 déoxy-3 isopropylidène-0-1,2 glucofuranose (35) et 4,100 g ($2,95 \cdot 10^{-2}$ mole) de para-nitrophénol sont chauffés une heure à 100° à l'abri de l'humidité. On ajoute ensuite au mélange devenu homogène, une goutte de pyridine et chauffe deux heures à

125-130° en agitant de temps à autre. Après refroidissement, on obtient une masse solide, noire, qui est purifiée en un premier temps par dissolution à chaud dans le volume minimum de méthanol. Par refroidissement progressif jusqu'à -10°, et après quelques heures à cette température, on obtient 5,5 g de cristaux très impurs. Par concentration des eaux-mères on obtient encore 0,5 g des mêmes cristaux (total : 6,00 g). La totalité du produit est dissoute dans le chloroforme et passée sur une colonne d'alumine neutre (150 g). L'élution de la colonne par le chloroforme donne 5,50 g ($1,69 \cdot 10^{-2}$ mole = 5%) d'un solide pur sur plaque de gel de silice. $F = 154^\circ$.

L'échantillon analytique a été recristallisé une fois supplémentaire dans le méthanol. $F = 155-156^\circ$.

Analyse : $C_{15}H_{19}NO_7 = 325$

Calculé % : C : 55,38	H : 5,89	N : 4,31
Trouvé % 55,29	5,95	4,32

Spectre ultra-violet ($C = 7 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 225 nm $\epsilon = 8.000$, λ_{min} 249 nm $\epsilon = 1.140$, λ_{max} 304 nm $\epsilon = 11.200$

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.485 cm^{-1} (OH), 1.515 , 1.350 et 850 cm^{-1} (NO_2 aromatique), 1.270 cm^{-1} (éther aromatique), 1.085 et 1.055 cm^{-1} (C=O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (MSO- d_6 , T.M.S. réf. int., 60 MC)

2 protons aromatiques, $\delta = 8,2$ ppm $J_{5''6''} = J_{3''2''} = 9,7$ c/s

2 protons aromatiques, $\delta = 7,18$ ppm $J_{2''3''} = 9,7$ c/s

H_1 , doublet, $\delta = 5,80$ ppm, $J_{1,2} = 3,5$ c/s

OH_5 , doublet, $\delta = 5,38$ ppm, $j = 5,2$ c/s

H_2 , "triplet", $\delta = 4,78$ ppm, $J_{2,3} = 3,7$ c/s

H_5 , 2 H_6 et H_4 , massif non résolu autour de $4,10$ ppm

2 H_3 , $\delta = 1,19$ ppm, 2 doublets, $J_{3,2} = 3,7$ c/s, $J_{3,4} = 10,5$ et $5,2$ c/s

2 CH_3 isopropylidène, 2 singulets à $\delta = 1,42$ et $1,27$ ppm.

Para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose XI

On dissout 4,850 g ($1,49 \cdot 10^{-2}$ mole) du para-nitrophényl éther précédent IX dans 35 ml d'acétonitrile et verse cette solution dans 350 ml d'eau contenant 15 g de résine Iowex-50 (H^+) $\times 8$ (100 - 200 mesh). On agite magnétiquement pendant 24 heures et chauffe à 70-80° pendant 1 h 30 pour terminer l'hydrolyse. La solution est filtrée et évaporée à sec. On obtient ainsi, après séchage sous vide, 4,00 g ($1,40 \cdot 10^{-2}$ mole = 94%) de

para-nitrophényl-0-6 déoxy-3-D-glucose X, solide hygroscopique, se transformant rapidement en une gomme à l'air. Ce sucre est dissout dans 300 ml d'eau. Après refroidissement à 0°, on ajoute 2,994 g ($1,40 \cdot 10^{-2}$ mole) de métapériodate de sodium dissout dans 25 ml d'eau, et laisse reposer une nuit à 0°. Il arrive fréquemment à ce stade qu'une partie du para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose précipite sous forme d'une gomme. La gomme est alors décantée et la solution additionnée de 3,420 g ($1,40 \cdot 10^{-2}$ mole) de dihydrate de chlorure de baryum. Après une dizaine de minutes, le précipité d'iodate de baryum est filtré et le filtrat évaporé à sec à $t < 30^\circ$. On obtient ainsi, avec le précipité précédent, 4,000 g d'une gomme qui est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n°2.847- 100 mesh - $\phi = 2,5$ cm, H = 50 cm, dans le chloroforme) en utilisant du chloroforme stabilisé par 0,5% d'alcool en poids comme éluant. Les fractions d'environ 10 ml ont été recueillies à l'aide de notre dispositif usuel. Dans ces conditions le para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose passe entre les fractions 100 et 200 (seules fractions donnant un test positif au réactif de Fiske) et se présente sous forme d'une gomme incolore (3,5g, 93% ou 1-1,5% sur la base du glucose de départ).

Chromatographie: feuille de gel de silice fluorescent Nagel Silv-N-HREUV.

1 seule tache révélable par H_2SO_4 - $R_F = 0,20$ ($CHCl_3$ -EtOH (30:10))

Spectre ultra-violet : $C = 1,44 \cdot 10^{-4}$ M/l dans CH_3OH

$\lambda_{max} 224$ nm $\epsilon = 6.300$, $\lambda_{min} 250$ nm $\epsilon = 1.040$, $\lambda_{max} 304$ nm $\epsilon = 9.600$.

Dérivé : Para-nitrophényl-0-5 déoxy-2 méthyl ribofuranoside XII

On dissout 2,150 g ($8,4 \cdot 10^{-3}$ mole) de para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose dans 15 ml de méthanol anhydre et ajoute à cette solution 0,3 ml de méthanol contenant 3% de HCl. On laisse reposer 20-30 minutes à température ambiante et neutralise par 0,300 g de carbonate d'argent avant de filtrer sur un mélange célite-charbon actif. On obtient ainsi, après évaporation à sec du filtrat, 2,100 g ($7,8 \cdot 10^{-3}$ mole - 92%) d'une gomme jaunâtre se solidifiant par séchage sous vide et qu'il est possible de recrystalliser dans l'oxyde d'isopropyle additionné de n-heptane pour analyse. $F = 70^\circ$.

Analyse : $C_{12}H_{15}N O_6 = 269$

Calculé % C : 53,53

H : 5,62

N : 5,20

Trouvé % 53,40

5,50

5,33

Spectre ultra-violet : ($C = 7,68 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 223 nm $\epsilon = 6.500$, λ_{min} 250 nm $\epsilon = 1.300$, λ_{max} 307 nm $\epsilon = 10.000$.

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{26} = -47,5$ ($C = 1,3$ dans CHCl_3)

Spectre de résonance magnétique nucléaire : MSO-d_6 , 60 M.C., T.M.S réf.int.)

2 protons aromatiques (3" et 5"), $\delta = 8,20$ ppm

$$J = 9,7 \text{ c/s}$$

2 protons aromatiques (2" et 6"), $\delta = 7,20$ ppm, $J = 9,7$ c/s

OH_3 , doublet, $\delta = 5,30$ ppm, $J = 4,5$ c/s

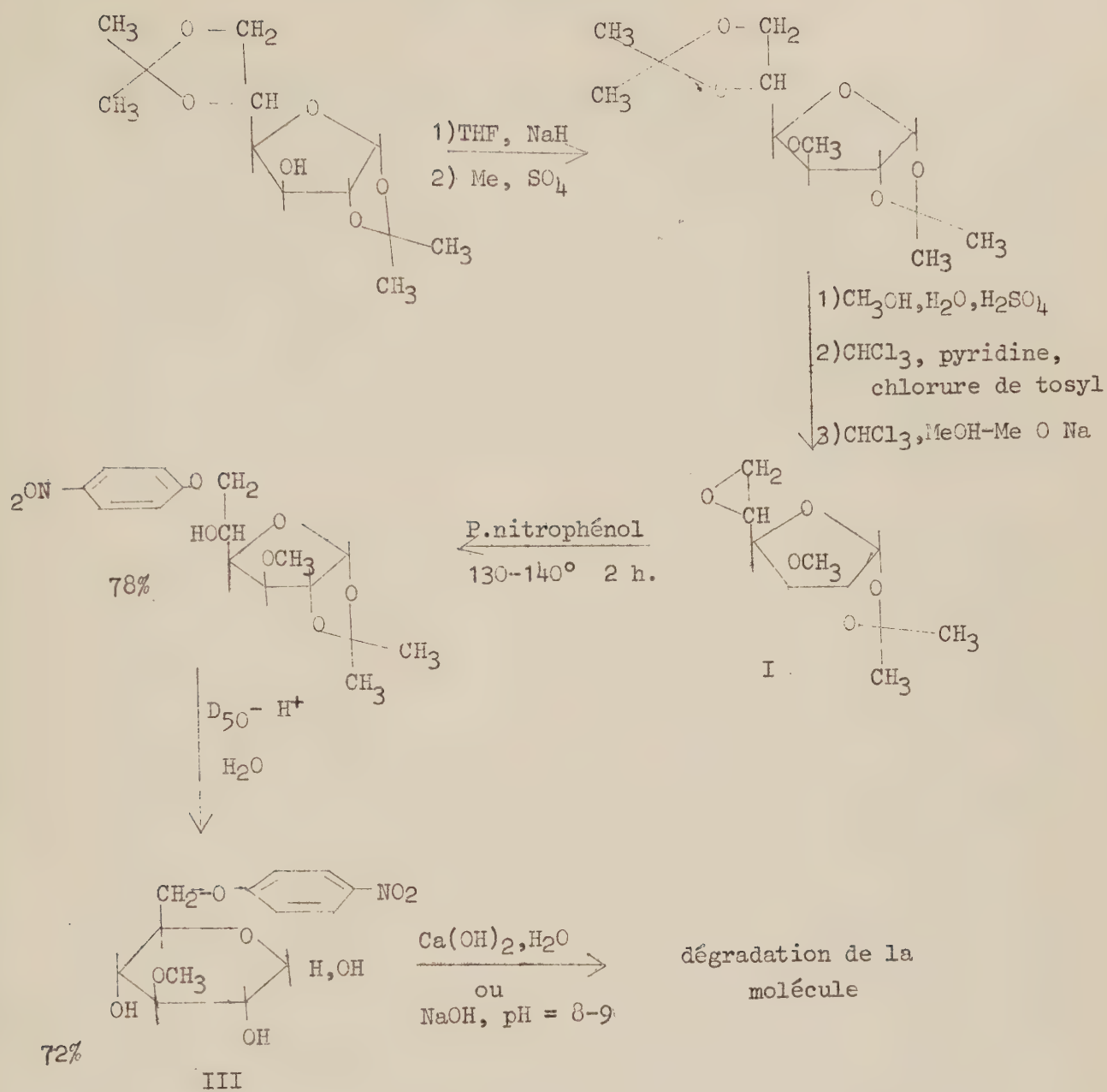
H_1 , quadruplet, $\delta = 5,07$ ppm, $J_{1,2} = 2,6$ c/s et $J_{1,2'} = 4,5$ c/s

H_3 , H_4 et 2H_5 , massif non résolu, $\delta = 4,15$ ppm

CH_3 en 1, singulet, $\delta = 3,2$ ppm

2 H_2 , massif, $\delta = 2,08$ ppm $J_{2,3} = 2,2$ et $3,7$ c/s $J_{2,1} = 2,2$ et $4,5$ c/s

Chapitre II - Schémas réactionnels



C H A P I T R E I I

=====

Para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose

En 1954 Kenner et Richards (38) préparèrent la benzyl-0-5 déoxy-2-D ribose à partir de benzyl-0-6 méthyl-0-3-D glucose. Ce dernier était traité par l'hydroxyde de calcium dans l'eau pour donner le sel de calcium de l'acide benzyl-0-6-D glucométasaccharinique qui, après avoir subi la dégradation de Ruff par le mélange $H_2O_2-Fe^{3+}$, donnait directement, avec un rendement convenable, le benzyl-0-5 déoxy-2-D ribose. Il nous avait donc paru intéressant de tenter la même réaction sur le para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D glucose dans le but de préparer le para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D ribose par une méthode plus directe que celle utilisée précédemment.

L'anhydro-5,6 méthyl-0-3 isopropylidène-0-1,2-D glucofuranose I, matière première de notre synthèse, a été préparé à partir de méthyl-0-3 di-isopropylidène- β -glucofuranose (39). Ce dernier, après hydrolyse de l'isopropylidène-5,6, tosylation en 6 et traitement par un équivalent de méthoxide de sodium, nous a donné l'anhydro sucre I (38) qui, chauffé en présence de para-nitrophénol à 130-140° pendant 2 heures, a donné, après purification, 78% de para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3 isopropylidène-0-1,2- α -D glucofuranose II dont les spectres usuels correspondent bien à la structure attendue. Enfin II a été hydrolysé en para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D glucose III par la résine Dowex-50 (H^+) dans l'eau avec un rendement de 72%. A ce stade, nous avons tenté la réaction utilisée par Kenner et Richards, et avons obtenu des produits, tout à fait anormaux semblant indiquer que la molécule avait été complètement dégradée dans ces conditions. Nous avons alors essayé la soude diluée entre pH 8 et 9 à 37° pour remplacer la chaux, sans plus de succès. Il est probable que dans des conditions normales, la réaction débute par une attaque des ions hydroxyles sur le carbone 1, puis d'une élimination du groupement $-OCH_3$ en 3 avec ouverture de la molécule pour donner ensuite l'acide glucométasaccharinique. Dans notre cas, nous avons retrouvé du para-nitrophénol mélangé à des goudrons et des produits non identifiés, ce qui permettrait de supposer que, parallèlement à l'attaque des ions hydroxyles sur le carbone 1, le carbone 6, lui-même activé par le groupement para-nitrophényl, subirait une attaque du même genre avec élimination d'un proton suivie de l'élimination d'un ion formiate, ce qui conduit à la destruction de toute la molécule

Partie Expérimentale

Para-nitrophényl-O-6 méthyl-O-3 isopropylidène-O-1,2-D glucofuranose II

11,514 g ($5,02 \cdot 10^{-2}$ mole) d'anhydro-5,6 méthyl-O-3 isopropylidène-O-1,2-D glucofuranose I et 7,075 g ($5,09 \cdot 10^{-2}$ mole) de para-nitrophénol anhydre sont mélangés intimement et chauffés deux heures à 100° à l'abri de l'humidité. On ajoute ensuite une goutte de pyridine et continue à chauffer 2 heures à $130-140^{\circ}$ en agitant occasionnellement. Après refroidissement, la masse solide noire obtenue, est dissoute dans le volume minimum de chloroforme et chromatographiée sur colonne d'alumine ($\phi = 3,5$ cm 150g Al_2O_3 neutre standard Fluka et 150 g Al_2O_3 basique Fluka non mélangées). L'élution de la colonne est poursuivie par le chloroforme jusqu'au passage du front jaune. Après évaporation à sec du chloroforme on obtient 13,900 g ($3,91 \cdot 10^{-2}$ mole = 78%) d'un solide hygroscopique.

Chromatographie : feuille de gel de silice Nagel Silv N-HR/W (CHCl_3)

1 seule tache R_F $\neq 0,24$

Spectre ultra-violet ($C = 10^{-4}$ mole/l dans CH_3OH)

$\lambda_{\text{max}} 225 \text{ nm}$ $\epsilon = 6.630$, $\lambda_{\text{min}} 250 \text{ nm}$ $\epsilon = 1.000$, $\lambda_{\text{max}} 305 \text{ nm}$ $\epsilon = 10.500$.

Spectre infra-rouge (sans solvant)

3.490 cm^{-1} (OH), 2.990 et 2.940 cm^{-1} (CH_3 isopropylidène), 2.840 cm^{-1} (OCH_3), 1.510 , 1.345 et 850 cm^{-1} (NO_2 aromatique), 1.465 , 1.455 et $1.375-1.365 \text{ cm}^{-1}$ (doublets $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.265 cm^{-1} (éther aromatique), 1.080 et 1.020 cm^{-1} (C-O éther)

Spectre de résonance magnétique nucléaire (CDCl_3 , T.M.S. réf. int., 60 MC)

2 protons aromatiques, $\delta = 8,18 \text{ ppm}$, $J = 9 \text{ c/s}$

2 protons aromatiques, $\delta = 6,95 \text{ ppm}$, $J = 9 \text{ c/s}$

H_1 , doublet, $\delta = 5,89 \text{ c/s}$, $J_{1,2} = 3,7 \text{ c/s}$

H_2 , $\delta = 4,60 \text{ ppm}$, $J_{2,1} = 3,7 \text{ c/s}$

H_4 , H_5 et H_3 , massif non résolu, $\delta = 4,25 \text{ ppm}$.

2 H_6 , doublet, $\delta = 3,95 \text{ ppm}$, $J_{6,5} = 3,5 \text{ c/s}$

OCH_3 en 3, singulet, $\delta = 3,48 \text{ ppm}$

OH_5 , $\delta = 2,80 \text{ ppm}$.

2 CH_3 isopropylidène, deux singulets à $\delta = 1,50$ et $1,35 \text{ ppm}$.

Para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D glucose III

L'isopropylidène précédent ($12,880 \text{ g} \sim 3,62 \cdot 10^{-2} \text{ mole}$) est dissout dans 100 ml d'acétonitrile et cette solution est versée dans 600 ml d'eau contenant 50 g de résine Iowex-50 H^+). On agite magnétiquement à température ambiante pendant 2 jours, puis on chauffe à $60-65^\circ$ pendant une heure, filtre et évapore à sec. On obtient 10,8 g d'un solide blanchâtre qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n°2847 = 100 mesh - colonne : $\phi \neq 3,8 \text{ cm}$, $H = 85 \text{ cm}$ dans CHCl_3). La colonne est éluée par le mélange chloroforme-alcool (90:10) et les fractions d'environ 15 ml sont recueillies par notre dispositif usuel, l'analyseur d'effluent étant réglé à 280 nm. Dans ces conditions, le para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D glucose passe entre les fractions 161 et 260 dont l'évaporation à sec donne 8,5 g ($2,6 \cdot 10^{-2} \text{ mole} = 72\%$) d'un solide blanc qu'il serait éventuellement possible de recristalliser dans le mélange acétone-éther, mais avec un rendement inférieur. L'analyse donnée ici correspond au sucre directement issu de la colonne.

Chromatographie : couche mince de gel de silice fluorescent Prolabo.

CHCl_3 -EtOH (85:15), 1 tache $R_F = 0,43$

isoprop anol- NH_4OH - H_2O (7:1:2), 1 tache $R_F = 0,75$

Analyse : $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_8 = 315,27$

Calculé % : C : 49,52 H : 5,44 N : 4,44

Trouvé % 49,71 5,33 4,59

Spectre ultra-violet ($C = 1,30 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$ dans CH_3OH)

$\lambda_{\text{max}} 227 \text{ nm}$, $\epsilon = 6.770$, $\lambda_{\text{min}} 250 \text{ nm}$, $\epsilon = 1.050.$, $\lambda_{\text{max}} 305 \text{ nm}$, $\epsilon = 11.000$

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.300 cm^{-1} (large bande OH), 1.500 , 1.330 et 850 cm^{-1} (NO_2 aromatique)
 1.265 cm^{-1} (éther aromatique), 1.080 et 1.030 cm^{-1} (C=O éther)

Spectre de résonance magnétique nucléaire (CD_3COCD_3 , 60 MC, T.M.S. réf.int.)

2 protons aromatiques, $\delta = 8,18 \text{ ppm}$, $J = 9 \text{ c/s}$

2 protons aromatiques, $\delta = 7,05 \text{ ppm}$, $J = 9 \text{ c/s}$

H_1 anomère, deux signaux à $\delta = 5,75 \text{ ppm}$ ($\sim 40\%$) et $\delta = 5,05 \text{ ppm}$ (60%)

H_6 , doublet, $\delta = 4,28 \text{ ppm}$, $J_{6,5} = 3,8 \text{ c/s}$

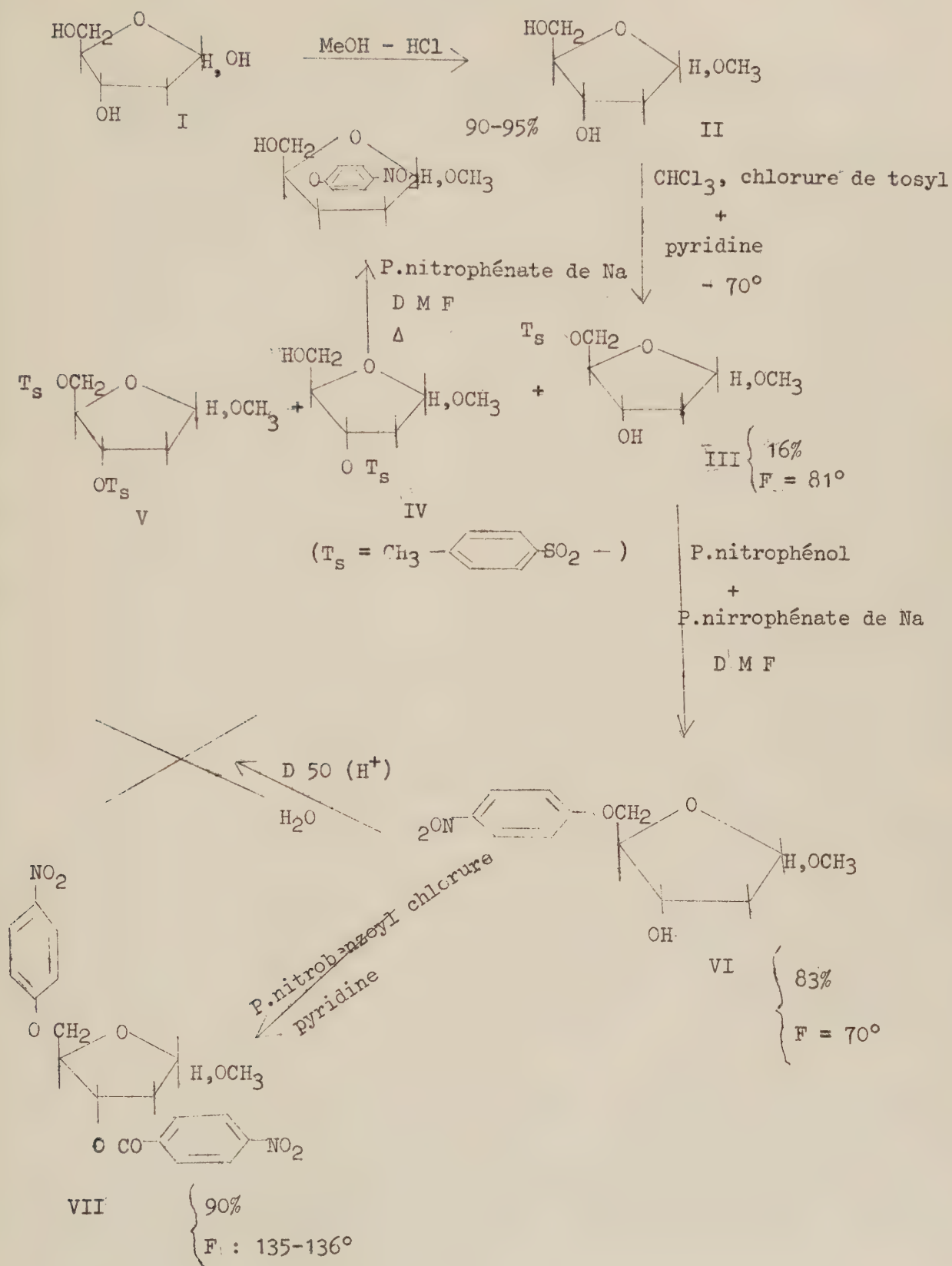
OCH_3 en 3, singulet, $\delta = 3,55 \text{ ppm}$

3 hydroxyles à $\delta = 3,08 \text{ ppm}$.

Mutarotation : $[\alpha]_D^{26} : + 58^\circ 9 \xrightarrow{18 \text{ heures}} + 60,05^\circ$ ($C = 1,07$, $\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ (1 : 1)).

- - - - -

Chapitre III - Schémas réactionnels



C H A P I T R E III

=====

Méthyl para-toluène sulfonyl-0-5 déoxy-2-D-riboside et méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-riboside.

L'aisance avec laquelle nous avons substitué jusqu'à présent un tosylate d'alcool primaire par l'ion para-nitrophénate dans le diméthyl formamide nous a amené à tenter la préparation directe du méthyl para-toluène sulfonyl-0-5 déoxy-2-D riboside à partir de déoxy ribose pour obtenir ensuite, selon notre méthode usuelle, le méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D riboside précédemment préparé à partir de glucose.

A cet effet, le méthyl déoxy-2-D riboside II a été préparé par traitement du déoxy ribose I par le méthanol chlorhydrique II traité par le chlorure de para-toluène sulfonyle dans le chloroforme ou le chlorure de méthylène à -70° en présence de pyridine conduit toujours à un mélange assez complexe, mais essentiellement constitué de trois produits majeurs : le tosylate en 5 attendu III, le tosylate en 3 IV et le di-tosylate-3,5 V. Il est assez surprenant de constater que cette réaction conduit toujours à ce même mélange alors que les tosylationes que nous avons précédemment effectuées sur l'isopropylidène-0-1,2-D glucofuranose, conduisent toujours, même dans des conditions nettement moins rigoureuses, à un seul produit qui est le tosylate correspondant en position 6. Nous avons alors varié les conditions réactionnelles. L'élévation de température, une forte dilution ou un défaut de chlorure de para-toluène sulfonyle n'augmentent pas le rendement en tosyl-0-5 déoxy ribose. Au contraire, à forte dilution et à température ambiante il ne s'en forme pas du tout. Il serait tentant d'expliquer cette anomalie par le fait que l'hydroxyle en 2, bien que secondaire, est en position axiale sur le cycle et donc privilégiée lors de l'attaque du chlorure, ce qui expliquerait la formation simultanée de III, IV, et V.

Le mélange réactionnel brut a pu être séparé en ses constituants principaux par chromatographie sur gel de silice avec un mélange chloroforme-alcool comme éluant. Le premier constituant important du mélange sortant de la colonne est vraisemblablement le di-tosylate V d'après le spectre ultra-violet ($\lambda_{\max}$ 225 nm, $\epsilon = 18.600$, $\lambda_{\max}$ 260 nm, $\epsilon = 1.150$)

et le spectre infra-rouge qui ne laisse pas apparaître de bande hydroxyle. Ce di-tosylate se décompose déjà partiellement sur la colonne et ne peut être conservé que quelques heures. Le constituant suivant est supposé être le tosylate en 3 IV (λ_{max} 225 nm, $\epsilon = 10.000$, λ_{max} 262 nm, $\epsilon = 535$) plus ou moins pur et qui est plus stable que le di-tosylate précédent. Enfin, en fin de chromatographie on isole le méthyl para-toluène sulfonyl-0-5 déoxy-2-D Riboside III avec un rendement oscillant entre 15 et 20%. III peut être conservé indéfiniment à 0° et a même pu être recristallisé ($\alpha = 81^\circ$). Le spectre de résonance magnétique nucléaire, pris dans le D.M.S.O. deutérié, laisse apparaître le signal de l'hydroxyle secondaire en 3 sous forme d'un doublet et le proton anomère donne un quadruplet, ce qui laisse supposer qu'ici encore, comme dans le cas du méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D riboside précédemment préparé, nous sommes en présence d'un composé α . D'ailleurs le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} = -43^\circ 7$ dans CHCl_3) est très voisin du méthyl para-nitrophényl riboside précédent et il est probable que le méthyl déoxy-2 riboside de départ est lui-même α et il en est ainsi pour toute la série.

Le tosylate III a été substitué par le para-nitrophénate de sodium dans le DMF. et après purification, le méthyl para-nitrophényl-0-5 ribofuranoside IV a été isolé avec un rendement de 83% en produit pur. Ce dérivé n'a pas été recristallisé et fondait à 70°. Son spectre de résonance magnétique nucléaire est comparable à celui du méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D ribofuranoside préparé à partir de glucose. Ici encore le proton anomère donne un quadruplet et le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} = -47^\circ 5$ dans CHCl_3) indique une structure α .

Il convient de signaler que IV traité par une résine échangeuse d'ions sous forme H^+ dans l'eau, n'a pu être déméthylé pour donner le para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D ribofuranose. Cette résistance à l'hydrolyse du groupement méthoxy anomérique semble être caractéristique des sucres dérivés du déoxy-2 ribose ainsi que nous le verrons plus loin sur un autre exemple. Le résidu de cette "hydrolyse manquée" a été directement transformé avec un rendement de 90% en méthyl para-nitrophényl-0-5 para-nitrobenzoyl-0-3 déoxy-2-D ribofuranoside V pour analyse.

Enfin, bien que nous ne le mentionnions pas dans la partie expérimentale, nous pouvons donner une preuve expérimentale supplémentaire, de l'isolement du tosylate d'alcool secondaire IV. Ce dernier, après avoir

été isolé par chromatographie sur colonne de gel de silice comme indiqué précédemment, a été substitué par le para-nitrophénate de sodium dans le DMF. et le mélange réactionnel rechromatographié sur gel de silice. Nous avons ainsi isolé un nouveau sucre qui serait le para-nitrophényl-0-3 déoxy-2-D xylofuranoside, étant donné que la substitution du groupement tosyl sur l'alcool secondaire 3 s'est accompagnée d'une inversion de configuration. Le spectre ultra-violet (λ_{max} 227 nm, $\epsilon = 6.900$ et λ_{max} 305 nm, $\epsilon = 10.600$) correspond à un éther du para-nitrophénol. Le spectre de résonance magnétique nucléaire pourrait confirmer la structure proposée. Le signal de la fonction alcool primaire en 5 est un triplet disparaissant par addition d'eau lourde. Le proton anomérique donne un quadruplet. Ce sucre serait encore α et nous n'en donnons le spectre dans le DM.S.O- d_6 à 60MC (T.M.S réf. int.) que pour confirmer la structure proposée.

4 protons aromatiques à $\delta = 8,25$ ppm (2 h)

et $\delta = 7,20$ ppm (2a) $J_{ab} = J_{ba} = 9$ c/s

OH en 5, triplet disparaissant par addition d'eau lourde,

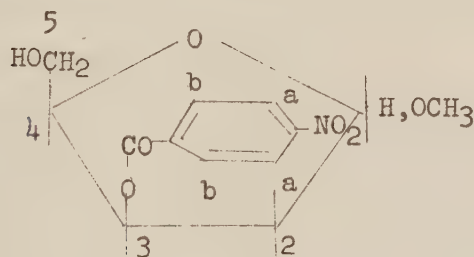
$\delta = 5,28$ ppm, $J = 4,5$ c/s

H_1 , quadruplet, $\delta = 5,02$ ppm, $J_{1,2} = 2,7$ et 6 c/s

OCH_3 , singulet, $\delta = 3,30$ ppm.

2 H_5 , H_4 et H_3 , massif mal résolu, $\delta = 4,18$ ppm

2 H_2 autour de 2,10 ppm.



Partie Experimentale

Méthyl déoxy-2-D ribofuranoside II

On dissout 8,244 g ($6,15 \cdot 10^{-2}$ mole) de déoxy-2-D ribose dans 165 ml de méthanol anhydre, ajoute 3 ml de méthanol chlorhydrique à 3% de HCl et laisse reposer 20 min. à 27° avant de neutraliser par 4,3 g de carbonate d'argent. On filtre sur un mélange célite-charbon activé et évapore à sec pour obtenir 9,100 g d'une gomme sensiblement chromatographiquement pure.

Méthyl para-toluènesulfonyl-0-5 déoxy-2-D riboside III

8,880 g ($6 \cdot 10^{-2}$ mole) de méthyl déoxy-2-D riboside II et 11,430 g ($6,0 \cdot 10^{-2}$ mole) de chlorure de para-toluènesulfonyl sont dissous dans 100 ml de chlorure de méthylène anhydre fraîchement distillé sur P_2O_5 . La solution est refroidie à -70-80° à l'aide du mélange acétone-carboglace, puis, tout en agitant on ajoute goutte à goutte 13,5 ml de pyridine anhydre. La solution est maintenue deux heures à cette température, puis on laisse lentement revenir à température ambiante (en 12 heures) avant de verser le tout dans un litre d'eau et de glace. Le chlorure de méthylène est décanté et la phase aqueuse extraite par du chloroforme (2 x 100 ml). Les phases organiques mélangées sont lavées par une solution aqueuse de $KHCO_3$ (2 x 150 ml), à l'eau, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées à sec à température ambiante. On obtient ainsi 16,2 g d'une huile brune, dont le chromatogramme sur couche mince de gel de silice Prolabo indique, après révélation par H_2SO_4 , 3 constituants essentiels entourés d'impuretés mineures. $R_F \simeq 0,30$, $R_F \simeq 0,40$, $R_F \simeq 0,80-0,85$. Cette gomme est ensuite chromatographiée sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt, n°2847 - 100 mesh - $\phi = 3,8$ cm, H = 80 cm dans $CHCl_3$).

La colonne est éluée par le chloroforme stabilisé par 0,5% d'éthanol en poids et les fractions (12-15 ml) recueillies sur un collecteur automatique avec enregistrement et analyseur d'effluents (254 nm). On recueille ainsi 4 fractions essentielles qui toutes donnent un test positif au réactif de Dishe et qui sont chromatographiées sur couche mince dans le système précédent :

- | | | |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 1. 2,375 g | $R_F = 0,80$ et $0,85$. | Essentiellement le di-tosylate V |
| 2. 5,084 g | $R_F = 0,40$ | Essentiellement le monotosylate IV |
| 3. 5,082 g | $R_F = 0,40$ et $0,30$ | mélange de IV et du tosylate en 5 III |
| 4. 3,375 g | $R_F = 0,30$ | III pratiquement pur. |

Les fractions 1 et 2 ne tardent pas à se décomposer et ne sont pas purifiables. 3 pourrait être rechromatographiée pour améliorer le rendement en III (la teneur en III est variable). La fraction 4, après évaporation à sec, donne une gomme qui ne tarde pas à se solidifier (3,375 g) et qui est le méthyl paratoluène sulfonyl-O-5 déoxy-2-D-ribofuranoside III. Ce dernier a pu être recristallisé avec précautions par dissolution dans l'oxyde d'isopropyle et concentration au maximum en évitant un chauffage prolongé. Après quelques heures à 0° on obtient 2,8 g ($9,8 \cdot 10^{-3}$ mole - 16%) de cristaux blancs qui seront conservés à $t < 0^\circ$. $F = 81^\circ$. puis sur plaque dans le système précédent. $R_F = 0,27$.

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{26} = -43^\circ 7$ ($C = 1,13$ dans $CHCl_3$)

Analyse : $C_{13}H_{18}SO_6 = 302,27$

Calculé %	C : 51,65	H : 6,00	O : 31,75
Trouvé %	51,62	6,00	31,69

Spectre ultra-violet ($C = 1,6 \cdot 10^{-4}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 229 nm $\epsilon = 8.050$, λ_{min} 245 nm $\epsilon = 250$. Nombreux petits maxima d'absorption autour de 260 nm, λ_{max} 261 nm $\epsilon = 630$

Spectre infra-rouge : (produit pur)

3.440 cm^{-1} (large bande OH), 2.920 cm^{-1} (CH_3), 2.835 cm^{-1} (OCH_3), 1.350 et 1.175 cm^{-1} ($S = O$), 1.080 et 1.040 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 MC, T.M.S. réf. int.)

2 protons aromatiques, $\delta = 7,75$ ppm, $J = 7,5$ c/s

2 protons aromatiques, $\delta = 7,40$ ppm, $J = 7,5$ c/s

OH en 3, doublet, $\delta = 5,18$ ppm, $J = 4,5$ c/s

H_1 , quadruplet, $\delta = 4,80$ ppm, $J_{1,2} = 2,6$ et $4,2$ c/s

2 H_5 , H_4 et H_3 , massif partiellement résolu, $\delta = 3,95$ ppm,

CH_3 aromatique, singulet, $\delta = 2,40$ ppm.

OCH_3 , singulet, $\delta = 3,02$ ppm.

2 H_2 , massif non résolu, $\delta = 1,35$ ppm

CD_3COCD_3 , 60 MC, T.M.S. réf. int.

2 protons aromatiques, $\delta = 7,78$ ppm, $J = 9$ c/s

2 protons aromatiques, $\delta = 7,30$ ppm, $J = 9$ c/s

H_1 , quadruplet, $\delta = 5,0$ ppm, $J_{1,2} = 2,7$ et $4,5$ c/s

2 H_5 et H_4 , massif non résolu, $\delta = 4,55$ ppm

OCH_3 , singulet, $\delta = 3,20$ ppm

CH_3 aromatique, singulet, $\delta = 2,45$ ppm

2 H_2 , multiplet, $J_{2,1} = 2,7$ et $4,5$ c/s et $J_{2,3} = 1,5$ et $4,5$ c/s

Méthyl para-nitrophényl-O-5 déoxy-2-D ribofuranoside IV

On dissout 1,477 g ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mole) de méthyl para-toluène sulfonyl-O-5 déoxy-2-D-riboside III, 3,091 g (4 équivalents) de para-nitrophénate de sodium et 0,667 g (un équivalent) de para-nitrophénol dans 30 ml de D.M.F. anhydre fraîchement distillé sur anhydride phosphorique et chauffe à 100-110° à l'abri de l'humidité pendant quatre heures. On évapore à sec (30°) en rajoutant 3 fois de l'eau. Le résidu est repris par le chloroforme et la phase organique lavée à l'eau (4 fois), séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. On obtient ^{un produit} (1,664 g) dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice ($\text{C}_6\text{H}_6\text{-CH}_3\text{COOEt}$ (80:20)) révèle deux constituants. Ce solide est chromatographié sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n° 2847- 100 mesh) $\varnothing = 2,8$ cm, H = 50 cm dans C_6H_6). La colonne est élevée par le mélange $\text{C}_6\text{H}_6\text{-CH}_3\text{COOEt}$ (80:20) et les fractions de 15 ml recueillies avec notre matériel usuel. On recueille ainsi successivement deux constituants, prépondérants : 0,480 g de para-nitrophénol et 1.100 g ($4 \cdot 10^{-3}$ mole - 83%) du sucre attendu IV sous forme de gomme se solidifiant sous vide. F = 70°.

Chromatographie : Couche mince de gel de silice Prolabo ($\text{C}_6\text{H}_6\text{-CH}_3\text{COOEt}$ (70:30) - Une seule tache $R_F \neq 0,30$ et identique à celle de l'échantillon du même sucre préparé précédemment à partir de glucose.

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{26} = -47,5$ (C = 1,4 dans CHCl_3)

Spectre ultra-violet : (C = $1,4 \cdot 10^{-4}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 226 nm, $\epsilon = 6.040$, λ_{min} 249 nm, $\epsilon = 935$, λ_{max} 305 nm; $\epsilon = 9.860$.

Spectre infra-rouge (dans le nujol)

3.430 cm^{-1} (OH), 1.500; 1.340 et 850 cm^{-1} (NO_2 aromatique), 1.260 cm^{-1} (éther aromatique), 1.080 et 1.050 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 MC, T.M.S. réf. int.)

2 protons aromatiques, $\delta = 8,24$ ppm, J = 12 c/s

2 protons aromatiques, $\delta = 7,20$ ppm, = 9 c/s

OH en 3, doublet, $\delta = 5,32$ ppm, J $\simeq$ 4,5 c/s

H_1 , quadruplet, $\delta = 5,18$ ppm, $J_{1,2} = 2,7$ et 4,5 c/s

H_3 , H_4 et 2 H_5 , massif non résolu à $\delta = 4,18$ ppm

2 H_2 , multiplet, $\delta = 2,10$ ppm.

Méthyl para-nitrophényl-O-5 para-nitrobenzoyl-O-3 déoxy-2- D-ribofuranoside V

0,350 g ($1,30 \cdot 10^{-3}$ mole) de méthyl para-nitrophényl-O-5-D-riboside IV et 0,532g ($2,87 \cdot 10^{-3}$ mole) de chlorure de para-nitrobenzoyl sont dissouts dans 10 ml de pyridine anhydre et abandonnés 24-36 heures à température ambiante. On verse dans l'eau et extrait par du chloroforme (3 fois). La phase organique est lavée par 100 ml d'une solution à 1% d'acide sulfurique, à l'eau saturée en KHCO_3 , séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. On obtient 0,627 g d'un solide qui, après recristallisation dans le minimum de méthanol, donne 0,350 g de cristaux. $F = 133-135^\circ$ (85%). L'échantillon analytique a été recristallisé une deuxième fois dans les mêmes conditions. $F = 135-136^\circ$.

Analyse : $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9 = 414$

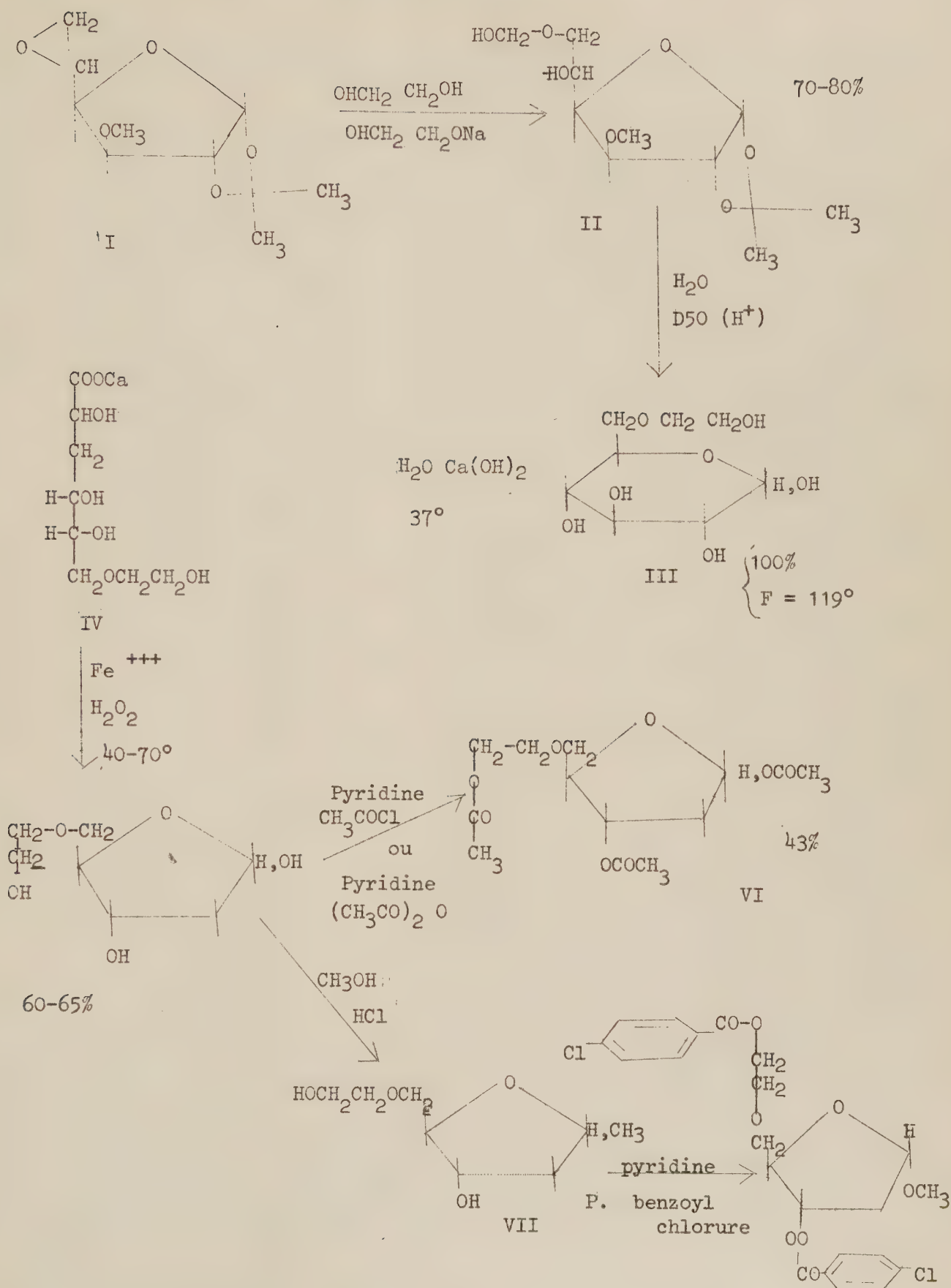
Calculé %	C . 55,07	H : 4,34	N : 6,76
Trouvé %	53,31	4,40	6,76
	55,55	4,65	6,56

Spectre ultra-violet ($C = 7,45 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 219 nm, $\epsilon = 10.740$, λ_{max} 228 nm, $\epsilon = 10.800$, λ_{min} 237 nm $\epsilon = 9.530$,
 λ_{max} 263 nm $\epsilon = 15.100$, λ_{min} 285 nm $\epsilon = 12.080$, λ_{max} 303 nm $\epsilon = 13.820$

- - - - -

Chapitre IV - Schémas réactionnels



C H A P I T R E IV

=====

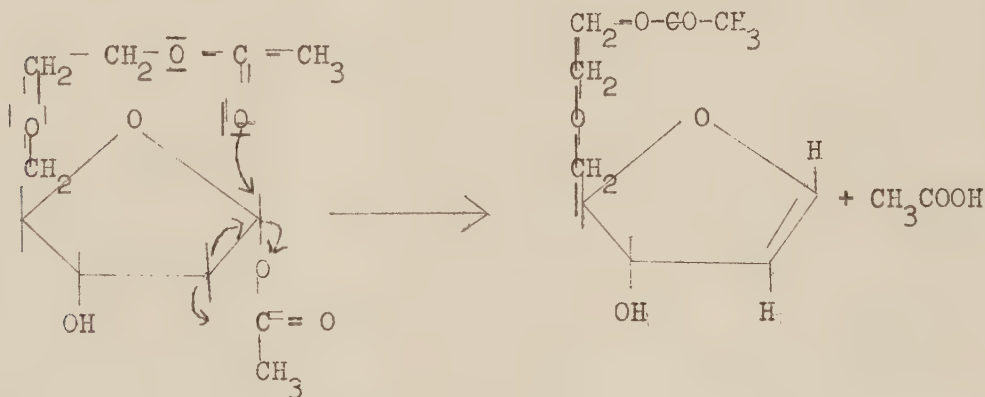
 β -hydroxy éthyl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose et β -hydroxy éthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose

L'oxydation possible d'une fonction alcool primaire en carboxyle par l'oxygène et le platine d'Adams⁽⁴⁰⁾, nous a conduit à envisager la synthèse de l'hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose V. En effet ce sucre, convenablement protégé, est destiné à des condensations ultérieures sur différentes bases puriques et pyrimidiques et il est important que la fonction éther en 5 du sucre soit aussi peu réactive que possible pour résister aux différents traitements imposés lors des condensations. Les para-nitrophényl éthers synthétisés jusqu'à présent semblent un peu trop fragiles à priori. Après condensation, la fonction alcool primaire est débloquée et oxydée en acide carboxylique. Ainsi le groupement destiné à assurer la condensation entre le nucléoside synthétique et le support choisi n'apparaît qu'en dernier lieu après la condensation, diminuant ainsi les chances de rupture de la fonction éther au cours des étapes précédentes. C'est donc dans ce but que nous avons synthétisé V et ses dérivés protégés VI et VIII dont l'un d'eux VI sera condensé sur la N-benzamidopurine dans le prochain chapitre.

Le traitement de l'anhydro-5,6 méthyl-0-3 isopropylidène-0-1,2-D-glucofuranose I (38) par le monoglycolate de sodium en utilisant le glycol comme solvant, nous a donné le β -hydroéthyl-0-6 méthyl-0-3 isopropylidène-0-1,2-D-glucofuranose II avec un rendement de 70 à 80% en sucre brut dont la pureté est suffisante pour en justifier l'hydrolyse immédiate dans l'eau par une résine acide en hydroxyéthyl-0-6 méthyl-0-3-glucose III cristallin. Ce dernier traité par l'hydroxyde de calcium selon la méthode de Richards et Kenner (38) a été dégradé selon la méthode de Ruff (38) en β -hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose V. Toute tentative de purification de ce sucre, échoue. Son passage sur colonne de gel de silice s'accompagne de l'apparition de nouveaux produits et de plus, il se décompose assez rapidement dans le temps. V a donc été méthylé en méthyl hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribofuranoside VII qui a pu être obtenu pratiquement pur par chromatographie sur gel de silice. VII traité par le chlorure de parachlorobensoyle, a donné VIII qui, après une nouvelle chromatographie a pu être obtenu suffisamment pur pour être analysé. Ce dernier dérivé

étant encore une gomme, nous avons tenté une déméthylation en 1 dans le but de préparer un para-phénylazobenzoate en 1 supposé être cristallin. Toutes les tentatives de déméthylation se sont révélées sans aucune action et VIII se décomposait avant d'être hydrolysé. Dans tous les cas, nous avons retrouvé une forte proportion de VIII accompagnée de produits de décomposition. Cette résistance à l'hydrolyse du groupement méthoxy acétallique a été rencontrée pour tous les méthyl déoxy-2 ribosides préparés et semble être caractéristique de ces derniers.

Enfin l'hydroxyéthyl-O-5 déoxy-2-D-ribose V a été peracétylé par le chlorure d'acétyl dans la pyridine en hydroxyéthyl-O-5 tri-acétyl-O-5:3 =1 -D-ribofuranose VI, gomme amorphe non recristallisable et dont la purification est assez délicate. Ce dérivé a en effet, tendance à se déacétyler spontanément pour donner différents produits de décomposition dont certains sont fluorescents et sont vraisemblablement des dérivés de l'aldéhyde furfurylique. On peut supposer que cette décomposition spontanée est due à l'élimination très facile de l'acétate en 1 par suite de la présence de nombreux atomes nucléophiles sur la chaîne flexible fixée en position 5. Cette élimination induite se poursuivrait par l'élimination d'un proton en position 2 donnant naissance à un éthylénique instable, se décomposant à son tour immédiatement.



Cet acétate ne peut être distillé. Tout chauffage fait apparaître de l'acide acétique. Néanmoins, on peut l'obtenir avec une pureté acceptable par chromatographie rapide sur gel de silice et le caractériser par ses spectres infra-rouge et R.M.N.. VI n'a donc pas été analysé mais caractérisé indirectement par condensation sur la N-benzamidopurine. Le nucléoside obtenu a donné une analyse convenable.

Enfin, il est possible de prévoir que la seule forme stable du sucre est la forme VII qui est un méthyl riboside et que tout groupement protecteur s'il est un ester, aura tendance à induire une décomposition selon un mécanisme analogue au précédent et il n'est pas impossible que le sucre déprotégé V ne se décompose selon ce schéma.

o

o o

P a r t i e E x p é r i m e n t a l e

β -hydroxyéthyl-0-6 méthyl-0-3 isopropylidène-0-1,2- α -D-glucofuranose II

On fait réagir 20,0 g de sodium sur 200 ml de glycol fraîchement distillé sur sodium. Après refroidissement, on ajoute à cette solution 36,97 g (0,163 mole) d'anhydro-5,6 méthyl-0-3 isopropylidène-0-1,2- α -D-glucofuranose I dissous dans 100 ml de glycol. On agite jusqu'à ce que le mélange soit devenu parfaitement homogène et abandonne le tout 3 jours à température ambiante, à l'abri de l'humidité. La solution est ensuite amenée à pH 7 par une solution aqueuse d'acide acétique à 20% et extraite par du chloroforme (4 x 200 ml). La phase organique, après lavage à l'eau est séchée sur Na_2SO_4 , et évaporée à sec. L'huile obtenue est chauffée à 100° sous 0,1 mm de mercure pour éliminer le glycol restant, puis séchée sur P_2O_5 pour donner 35,850 g (0,129 mole - 73%) d'une gomme dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice (CHCl_3 -EtOH (90:10)), après révélation par H_2SO_4 , montre une tache ($R_F \neq 0,37$) entourée de quelques impuretés mineures.

β -hydroxyéthyl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose III

31,850 g (0,111 mole) du sucre précédent sont dissouts dans 200 ml d'eau et chauffés entre 80 et 90° sur bain-marie pendant 4 heures avec agitation en présence de 50 g de résine Dowex-50 (H^+). La solution est ensuite filtrée et évaporée à sec pour donner 26,00 g (100%) d'une huile incolore qui se solidifie rapidement et qui a été utilisée telle par la suite. Un échantillon analytique a été recristallisé une fois dans le méthanol et l'oxyde d'isopropyle. Cristaux blancs. $F = 119^\circ$.

Analyse : $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_7 = 238,23$

Calculé% : C : 45,37 H : 7,62 O : 47,01

Trouvé % : 45,60 7,71 46,85

Mutarotation : $\{\alpha\}_D^{26} + 85,2^\circ \xrightarrow[24 \text{ h.}]{\quad} + 54^\circ \text{ (C = 1,006 dans H}_{20}\text{)}$

Spectre infra-rouge : (dans le nujol)

3.390 et 3.280 cm^{-1} (larges bandes OH), 1.150 cm^{-1} (éther aliphatique), 1.080, 1.030 et 1.000 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO-d₆, 60 Mc, T.M.S. réf.int.)

H₁, doublet, $\delta = 6,37$ ppm, $J_{1,2} = 4,5$ c/s

OH₁, doublet, $\delta = 5,02$ ppm, $J = 5,2$ c/s

OH₂ et OH₈, massif, $\delta = 4,60$ ppm

OH₄, autour de 4,88 ppm

OCH₃, H₂, H₃, H₄, H₅ et 2H₈, massif non résolu autour de 3,50 ppm

2H₆ et 2H₇, massif, $\delta = 3,18$ ppm

β -hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribofuranose V

On dissout 90,0 g (0,378 mole) de β -hydroxyéthyl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose III brut dans 2,700 l. d'eau distillée exempte d'oxygène. On ajoute 100,0 g d'hydroxyde de calcium en poudre fine et laisse reposer à 37° pendant 80 heures en agitant de temps à autre. Cette solution est ensuite filtrée, saturée par CO₂, chauffée à ébullition pendant quelques minutes, filtrée et concentrée sous vide à 1,100 l. On ajoute ensuite à cette solution de β -hydroxyéthyl-0-6 glucométasaccharinate de calcium, 9,36 g d'acétate de baryum et 4,68 g de sulfate ferrique. La solution est portée à ébullition pendant quelques minutes, filtrée et refroidie à 40°. On ajoute alors 58 ml d'eau oxygénée à 30% (110 volumes) et chauffe doucement jusqu'à 55-60°. La réaction démarre alors et le mélange réactionnel est abandonné à lui-même. Lorsque la température a de nouveau atteint 40°, le même processus est recommencé. La solution, revenue à 40°, est ensuite filtrée et concentrée à 400 ml sous vide à $t \leq 30^\circ$, puis passée sur une colonne constituée d'un mélange de 150 g de résine échangeuse Dowex-50 (H⁺) et 100 g de résine amberlite IR-50 (OH⁻), le bas de la colonne étant uniquement constitué de 60 g d'amberlite IR-50 (OH⁻). Après lavage convenable de la colonne à l'eau, l'éluat est concentré sous vide jusqu'à environ 300 ml ($t < 30^\circ$) puis lyophilisé. On obtient une huile jaune foncé qui sera immédiatement conservée à -10° (45,2 g - 0,254 mole - 67% en sucre brut V).

Chromatographie : couche mince de gel de silice Prolabo - Révélation par H₂SO₄.

- CH₃COOEt-MeOH (75:25). Une tache largement prépondérante $R_F \neq 0,41$

- CH₃COOEt (85) -isopropanol-eau (2:1) (35). Une tache largement prépondérante, $R_F \neq 0,45$.

Tri-O-acétyl β -hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribofuranose VI

On dissout 27,0 g (0,151 mole) de β -hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribofuranose V dans 150 ml de pyridine anhydre et refroidi à 0°. On ajoute à cette solution, toujours à 0°, convenablement agitée et maintenue à l'abri de l'humidité, 43,1 ml de chlorure d'acétyle (4 équivalents) dans 100 ml de pyridine anhydre en une heure. L'agitation est poursuivie une heure puis le mélange est abandonné 20 heures à 0° à l'abri de l'humidité avant d'être versé dans 3 l. d'eau glacée, saturée en KHCO_3 . On extrait par du chloroforme (3 x 150 ml), lave à l'eau et sèche sur Na_2SO_4 après avoir ajouté du charbon activé. On évapore à sec (30°) pour obtenir une huile brune (35 g) dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice (C_6H_6 - CH_3COOEt (65:35), après révélation par H_2SO_4 , montre une forte tache ($R_F = 0,43$), correspondant aux deux anomères α et β , suivies et précédées de nombreux sous-produits.

Purification - La totalité du sucre précédent est chromatographié sur colonne de gel de silice (Davison - 65 - 325 mesh, grade 950 - $\phi = 4,2\text{ cm}$ H = 90 cm) en opérant aussi rapidement que possible. L'élution de la colonne est opérée à l'aide des mélanges suivants : C_6H_6 (1 l.), C_6H_6 -Et₂₀ (8:2) (5 l.), C_6H_6 - CH_3COOEt (7 : 3) (4 l.), C_6H_6 - CH_3COOEt (1 : 1) (2 l.), Et₂₀ pur (1 l.). Les fractions d'environ 300 ml sont chromatographiées sur couche mince de gel de silice, ce qui permet d'isoler 20,00 g de sucre acétylé VI ($6,5 \cdot 10^{-2}$ mole soit 43% par rapport au sucre V) dont la chromatographie indique qu'il est pratiquement pur.

L'échantillon dont nous avons tiré les spectres infra-rouge et R.M.N. qui suivent, a été purifié plus minutieusement sur le même gel de silice à partir de 0,592 g de sucre acétylé brut. La colonne ($\phi = 1,5\text{ cm}$, H = 50 cm) était constituée de 50 g de gel de silice dans le benzène. Son élution par 400 ml de C_6H_6 -Et₂₀ (80:20) et 500 ml de C_6H_6 -Et₂₀ (70:30) a donné 0,300 g de VI rigoureusement pur en prenant des fractions ne dépassant jamais 40 ml.

Spectre infra-rouge (liquide pur)

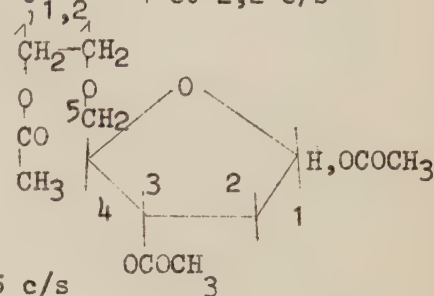
2.980, 2.960 et 2.890 (CH_3 et CH_2), 1.790 cm^{-1} (acétate anomérique), 1.860 et 1.840 cm^{-1} (deux C=O acétate), 1.440 et 1.375 cm^{-1} ($\text{C}-\text{CH}_3$), 1.230 cm^{-1} (C-O acétate, large bande), 1.140 cm^{-1} (éther aliphatique), 1.060 cm^{-1} (C-O éther).

Spectre infra-rouge (liquide pur) du même produit conservé quelques jours à température ambiante. On note les anomalies suivantes :

- 3.470 cm^{-1} : apparition d'une large bande OH.
- disparition de la bande acétate anomérique à 1.790 cm^{-1}

Spectre de résonance magnétique nucléaire : (CDCl_3 , 60 MC, T.M.S., réf. int.)

- H_1 , essentiellement un quadruplet, $\delta = 6,30\text{ ppm}$ $J_{1,2} = 4$ et $2,2\text{ c/s}$
- H_3 , multiplet, $\delta = 5,20\text{ ppm}$, $J_{3,4} = 9,7\text{ c/s}$
 $J_{3,2} = 4,5\text{ c/s}$
et $J_{3,2} = 1,5\text{ c/s}$
- H_4 , multiplet, $\delta = 4,45\text{ ppm}$, $J_{4,3} = 10,5\text{ c/s}$
et $J_{4,5} \approx 3,5\text{ c/s}$
- H_5 et $2\text{ H}_1'$, multiplet, $\delta = 3,65\text{ ppm}$, $J_{1,2'} = 4,5\text{ c/s}$
et $J_{5,4} = 3,7\text{ c/s}$
- 11 protons (3 CH_3 acétyl et 2 H_2), massif, autour de $2,10\text{ ppm}$.
- H_2' , multiplet, $\delta = 4,15\text{ ppm}$, $J_{2,1'} = 4,5\text{ c/s}$



Méthyl β -hydroxyéthyl-5-déoxy-2-D-ribofuranoside VII

On dissout $14,563\text{ g}$ du sucre déprotégé V ($\sim 8.10^{-2}$ mole dans 220 ml de méthanol anhydre, ajoute $4,00\text{ ml}$ d'une solution méthanolique chlorhydrique contenant 3% de HCl et on abandonne la solution pendant 25 minutes à température ambiante. La solution est neutralisée à l'abri de la lumière par $5,73\text{ g}$ de carbonate d'argent. On filtre sur un mélange célite-charbon-activé et évapore à sec ($15,0\text{ g}$).

Méthyl β -hydroxyéthyl-5-déoxy-2-D-ribofuranoside-di-parachlorobenzoate VIII

On dissout $15,00\text{ g}$ ($\sim 8.10^{-2}$ mole) de sucre méthylé précédent dans 100 ml de pyridine anhydre et refroidi à 0° . On ajoute à cette solution $42,94\text{ g}$ de chlorure de para-chlorobenzoyl ($31,3\text{ ml}$ - 3 équivalents) dissout dans 60 ml de pyridine anhydre et refroidis également à 0° . La solution obtenue est abandonnée 24 heures à 0° et occasionnellement agitée. On verse ensuite dans deux litres d'eau glacée saturée en KHCO_3 , extrait par du chloroforme ($3 \times 200\text{ ml}$), lave à l'eau, sèche sur un mélange Na_2SO_4 -carbone activé, filtre et évapore à sec pour obtenir une masse pâteuse semi-cristalline dont la chromatographie sur couche mince de gel de silice (C_6H_6 - CH_3COOEt (6:4), révélée par H_2SO_4 , montre deux taches essentielles de $R_F = 0,66$ et $0,73$ qui sont les deux anomères α et β .

La totalité du résidu est dissoute dans l'alcool à chaud. En refroidissant, la solution laisse déposer des cristaux (environ 10 g) qui sont éliminés. Les eaux mères de recristallisation sont évaporées à sec et dissoutes à chaud dans un peu de benzène. Les cristaux d'acide p.chlorobenzoïque qui se déposent au refroidissement (2,500 g) sont filtrés et la solution réévaporée à sec. La gomme obtenue (35 g) est ensuite chromatographiée sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n° 7.083-CC-7 100-200 mesh - $\phi = 4$ cm, H = 90 cm dans CHCl_3) en utilisant comme éluant le chloroforme (3 l.), puis le mélange CHCl_3 -EtOH (98:2) etc... En fractionnant convenablement (100 ml) on a isolé 20 g de sucre protégé VIII ($4,5 \cdot 10^{-2}$ mole 56%) en 3 fractions dont la première ($R_F = 0,73$ dans le système précédent) avait un pouvoir rotatoire de $-12^\circ 92$ ($C = 1,053$ dans CHCl_3), la deuxième de $+49^\circ$ ($C = 1,03$ dans CHCl_3) et présentait deux taches sur gel de silice ($R_F = 0,73$ et $0,67$) et la dernière un peu moins pure en sucre avait un pouvoir rotatoire de $+25^\circ$ ($C = 1,08$ dans CHCl_3) et était constituée par l'anomère de $R_F = 0,67$. Ce sucre pratiquement pur peut être conservé indéfiniment entre 0 et 10° . Pour analyse, un échantillon de ce sucre (1,000g) pris dans la fraction intermédiaire, a été purifié par chromatographie sur couche épaisse de gel de silice fluorescent Prolabo ($0,5$ cm - 20×20 cm). Cette plaque a été chromatographiée deux fois dans le benzène et deux fois dans le mélange C_6H_6 - CH_3COOEt (90:10). La bande contenant les deux dérivés α et β est découpée, finement pulvérisée et extraite par le mélange benzène-acétate d'éthyle (1:1) pour donner 0,900 g d'une gomme incolore. $[\alpha]_D^{26} = +40,7^\circ$ ($C = 1,075$ dans CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{Cl}_2 = 465$

Calculé % C : 56,28 H : 4,69

Trouvé % : 56,06 4,86

 56,06 5,04

Spectre ultra-violet ($C = 4,90 \cdot 10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{max} 240 nm, = 42.440

Spectre infra-rouge (liquide pur)

1.275 et 1.255 cm^{-1} (CH_2), 1.840 cm^{-1} (OCH_3), 1.720 cm^{-1} (forte bande $\text{C}=\text{O}$), 1.270 cm^{-1} (forte bande $\text{C}-\text{O}$ aromatique), 1.080 et 1.065 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ éther).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (CDCl_3 , 60 MC, T.M.S. réf. int.)

4 protons aromatiques, massif, $\delta = 8,00$ ppm, $J = 8,7$ c/s

4 protons aromatiques, massif, $\delta = 7,42$ ppm, $J = 8,7$ c/s

H₁, multiplet, $\delta = 5,48$ ppm

H₃, multiplet, $\delta = 5,20$ ppm, $J_{3,4} = 9$ c/s, $J_{3,2} = 4,5$ et $1,5$ c/s

2H_7 et H_4 , multiplet, $\delta = 4,50$ ppm, $J_{7,6} = 4,5$ c/s et $J_{4,5} = 3,7$ c/s

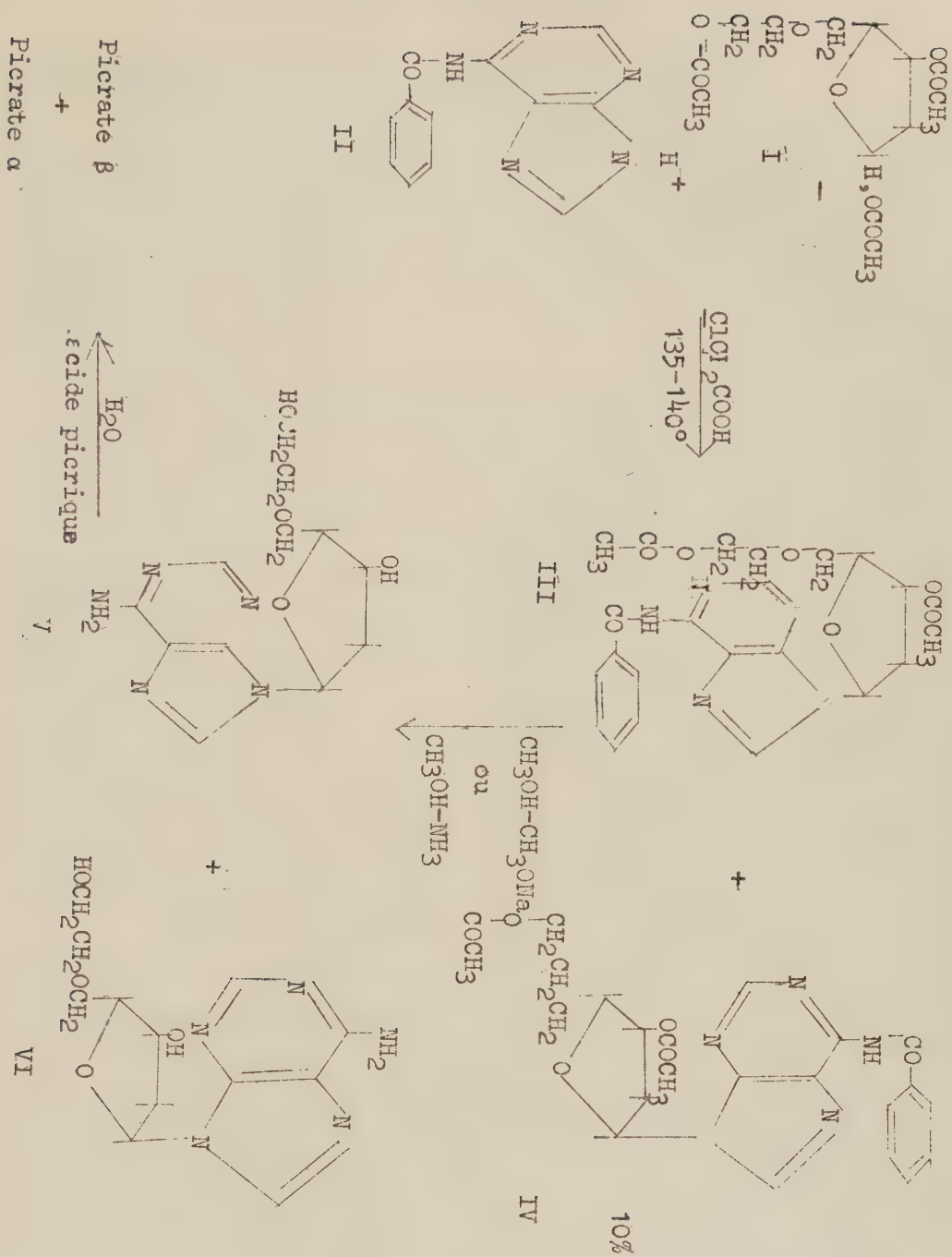
2 H₅ et 2 H₆, multiplet, $\delta = 3,90$ ppm, $J_{6,7} = 4,7$ c/s

OCH_3 , singlet, $\delta = 3.42$ ppm

2 H₂, massif mal résolu, $\delta = 2,35$ ppm.

[illegible]

CHAPITRE V : Schémas réactionnels



C H A P I T R E V

=====

β -hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- α et β -adénosine

Différentes méthodes sont généralement utilisées (41) pour la synthèse des différents nucléosides. Parmi celles-ci on peut citer : la méthode aux sels de métaux introduite par Fischer et Helferich (42), la méthode de Hilbert-Johnson (43,44), la méthode aux dérivés triméthylsilyl, la condensation directe des purines avec différents sucres, et enfin, l'interconversion des nucléosides.

Les deux premières méthodes de Hilbert-Johnson et de Fischer-Helferich, nécessitent la préparation de l'halogénose du sucre utilisé. Dans notre cas il ne nous a pas encore été possible de préparer un halogénose à partir du triacétate d'hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose I ou du di-para-chlorobenzoate de méthyl hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-riboside précédemment préparés. Le traitement du sucre I par le gaz chlorhydrique dans l'éther à 0°, selon la méthode utilisée par Venner (45) pour le triacetyl déoxy-2-D-ribofuranose (46), a abouti à une décomposition totale et immédiate du sucre et le di-para-chlorobenzoate de méthyl hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribofuranoside, traité par l'acide bromhydrique dans le chlorure de méthylène anhydre, ne semble pas donner l'halogénose attendu, mais plutôt des dérivés du furfuraldéhyde et d'autres dérivés non identifiés.

La récente découverte (47) de la synthèse de nucléosides par fusion d'une purine en présence d'un sucre peracétylé (48,49) nous a permis de synthétiser l'hydroxyéthyl-0-5'déoxy-2'adénosine α et β .

Le chauffage de la 6-benzamidopurine II avec le triacétate d'hydroxyéthyl-0-5 déoxy-2-D-ribofuranose I à une température comprise entre 135 et 145°, nous a donné les nucléosides protégés correspondants III et IV. Nous avons utilisé l'acide monochloracétique comme catalyseur. Cette réaction ayant un rendement global en dérivés α et β faible, nous avons essayé d'autres catalyseurs acides (acide para-toluènesulfonique, acide sulfurique, acide dichloracétique) sans constater d'amélioration dans le rendement. La même fusion effectuée sans catalyseur a également conduit aux deux dérivés α et β , avec un rendement identique, probablement par suite de la libération d'acide acétique par le sucre I à haute température. D'autre part, la très faible solubilité de la 6-benzamidopurine dans le sucre I, même en très large excès et à haute température, pourrait être la cause essentielle de la

faiblesse des rendements (4 - 7% en α et β). Selon Robins (50) l'utilisation de purines halogénées conduirait à un meilleur rendement dans ces réactions de fusion. Un essai de fusion du sucre I en présence de di-chloro-2,6 purine à 125° et de traces catalytiques d'acide monochloracétique a conduit à une décomposition totale et immédiate du mélange réactionnel.

Après fusion le mélange des nucléosides protégés obtenus III et IV a été purifié par chromatographie sur couche épaisse de gel de silice, suivie d'une chromatographie sur colonne de gel de silice. Les anomères III et IV ont ainsi été obtenus purs mais non séparés. Ce mélange, après traitement à température ambiante par le méthanol ammoniacal ou chauffage à reflux dans le méthanol en présence de traces catalytiques de sodium, conduit à l'hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- β -adénosine V et à l'hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- α -adénosine VI. Il n'est pas possible de séparer les anomères V et VI par chromatographie sur gel de silice quelque soit l'éluant utilisé. En reprenant les travaux de Dekker (51) qui avait séparé des mélanges de nucléosides sur résine Dowex-1 (OH^-) nous avons réussi à séparer parfaitement les anomères V et VI en utilisant une colonne de résine Dowex 1 - X_2 (OH^-) 100-200 mesh et comme éluant un gradient linéaire eau-méthanol-eau (1:1). L'anomère α VI est élué en premier, suivi après une vingtaine de fractions par l'anomère β V. L'avantage essentiel de cette méthode consiste dans le fait que les sucres libres et éventuellement la base du nucléoside ne sont pas élués par le mélange méthanol-eau. D'autre part, l'utilisation d'un gradient linéaire lors de l'élution de la colonne, permet d'éluer des fractions bien séparées et ne se recouvrent pas à condition d'utiliser une colonne de dimensions convenables.

La configuration absolue des deux anomères V et VI a été établie en utilisant les travaux de Robins et Robins (52) qui ont démontré que la configuration absolue des différents déoxy-2' nucléosides pouvait être établie par résonance magnétique nucléaire. Le spectre du dérivé V, pris dans le DMSO-d_6 , nous a permis de lui attribuer la configuration β . Le proton anomérique H_1 , donne un "pseudo-triplet" à $\delta = 6,42$ ppm avec une largeur de pic de 13,5 c/s et $J_{1,2} = 6,7$ c/s. Nous retrouvons ainsi exactement les valeurs données par Robins pour la déoxy-2'- β -adénosine. Le spectre de résonance magnétique nucléaire du dérivé VI, pris dans les mêmes conditions, nous a permis de lui attribuer la configuration α . Ici encore, nous retrouvons

les mêmes caractéristiques que celles données par Robins pour la déoxy-2'- α - adénosine. Le signal du proton anomérique est un quadruplet centré à $\delta = 6,32$ ppm dont la largeur de pic est de 10 c/s. Les couplages du proton 1' avec les deux protons 2' sont de 3,6 et 7,5 c/s.

D'autre part, les rotations de nos deux dérivés α et β sont en accord avec les configurations proposées. L'anomère α VI a un pouvoir rotatoire $\{\alpha\}_D^{22} = + 54^\circ$ ($C = 0,23$ dans H_{20}) et le début de la courbe de dispersion rotatoire montre un effet Cotton positif, comme la déoxy-2'- α -adénosine naturelle ($\{\alpha\}_D^{21} = + 73^\circ$ ($C = 1,1$ dans H_{20})). L'anomère β V a un pouvoir rotatoire négatif : $\{\alpha\}_D^{22} = - 13^\circ$ ($C = 0,85$ dans H_{20}) comme la déoxy-2'- β -adénosine naturelle ($\{\alpha\}_D^{21} = - 32^\circ$ ($C = 1,1$ dans H_{20})) et le début de la courbe de dispersion rotatoire montre un effet Cotton négatif. Enfin, les deux anomères présentent le même spectre ultra-violet (λ_{max} 260 nm $\epsilon = 13.500$ et 13.850) et ont été caractérisés par leurs picrates pour analyse. Il convient de signaler que les deux picrates des deux nucléosides α et β ont dû être préparés à 0° dans l'eau ou le méthanol, mais n'ont pu être recristallisés. En effet, tout chauffage, même pendant un temps très court, se traduit par une coupure de la liaison glycosidique due à l'acidité du milieu contenant de l'acide picrique, et il cristallise du picrate d'adénine. Ceci permet de souligner l'extrême sensibilité des dérivés V et VI en milieu acide et ce fait pourrait encore expliquer le faible rendement de la réaction de fusion précédente où le milieu réactionnel est obligatoirement acide et de plus, à une température élevée.

o

o

o

P a r t i e E x p é r i m e n t a l e

Di-acétyl-O-7',3' hydroxyéthyl-O-5' déoxy-2'-α et β-adénosine III et IV

On mélange intimement 1,510 g (3.10^{-3} mole) du sucre acétylé I et 0,478 g (2.10^{-3} mole) de 6-benzamidopurine II. Ce mélange est plongé brusquement dans un bain d'huile porté à 140° et maintenu à cette température avec agitation, jusqu'à ce qu'il y aie début de dissolution. On ajoute alors rapidement environ 10 mg d'acide monochloracétique et replonge le tout dans le bain d'huile pendant 10 minutes en agitant de temps à autre. L'acide acétique est alors rapidement éliminé sous vide et on laisse revenir à température ambiante. Le résidu est encuite trituré avec un peu d'acétate d'éthyle et la 6-benzamidopurine insoluble est filtrée. Le filtrat chromatographié sur couche mince de gel de silice ($\text{CH}_3\text{COOEt-EtOH}$ (95:5)) laisse apparaître deux taches fluorescentes ($R_F = 0,33$ et $0,41$), révélables par H_2SO_4 , et qui correspondent aux deux nucléosides protégés III et IV. Ce filtrat est concentré sous vide et déposé sur deux plaques épaisses de gel de silice (0,5 cm) et chromatographié dans le système précédent. La bande correspondant à III et IV est découpée et éluee par le méthanol et on évapore à sec. Le résidu est repris par le chloroforme et réévaporé à sec (0,400 g) pour être chromatographié sur colonne de gel de silice (Mallinckrodt n°2.847. $\varnothing = 20$ cm, $H = 50$ cm). L'élution de la colonne par le chloroforme pur puis le mélange chloroforme-méthanol (95:5) permet d'obtenir les nucléosides protégés III et IV pratiquement purs mais non séparés sous forme d'un verre solide sous vide, gommeux à l'air (0,100 g - 10% par rapport à la 6-benzamido purine).

Spectre ultra-violet ($C = 5.10^{-5}$ M/l dans MeOH)

$\lambda_{230 \text{ nm}} = 13.000$, $\lambda_{\text{min}} 247 \text{ nm}$ $\epsilon = 9.950$

$\lambda_{\text{max}} 279 \text{ nm}$, $\epsilon = 19.000$.

Spectre infra-rouge (dans CHCl_3)

3.400 cm^{-1} (NH), 3.000 cm^{-1} (CH_3), 1.740 cm^{-1} (C=O acétate), 1.710 cm^{-1} (C=O benzoyl), 1.460 cm^{-1} (CH_3), 1.240 cm^{-1} (large bande C-O acétate), 1.090 1.060 et 1.020 cm^{-1} (C-O éther)

Spectre de résonance magnétique nucléaire (CDCl₃. 60 M.C. TMS. réf.int.)

NH en 6, singulet, $\delta = 8,78$ ppm

H₈, singulet, $\delta = 8,51$ ppm

H₂, singulet, $\delta = 8,32$ ppm.

2 protons aromatiques, massif, $\delta = 8,0$ ppm

3 protons aromatiques, massif, $\delta = 7,52$ ppm

H₁', multiplet mal résolu, $\delta = 6,68$ ppm

H₃ et 2 H₇', deux massifs à $\delta = 4,58$ et $4,30$ ppm respectivement

2 H₅', 2 H₆' et H₄', massif à $\delta = 3,80$ ppm.

2 H₂', $\delta = 2,75$ ppm

6 protons acétyl, singulet à $\delta = 2,15$ ppm

β -hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- α -et- β -adénosine VI et V

1er procédé : On dissout 0,48 g (10^{-3} mole) du nucléoside protégé précédent dans 20 ml de méthanol anhydre, refroidi à 0° et saturé par NH₃ à 0°. Cette solution est abandonnée 24 heures à température ambiante en tube scellé et ensuite évaporée à sec

2ème procédé : 0,480 g (10^{-3} mole) du nucléoside protégé dans 20 ml de méthanol sont chauffés à reflux à l'abri de l'humidité pendant 1 h 30, en présence de 1 ml d'une solution normale de méthoxide de sodium dans le méthanol. La solution est ensuite évaporée à sec.

Le résidu précédent est dissout dans un peu d'eau et déposé au sommet d'une colonne ($\phi = 4,4$ cm, H = 90 cm) de résine Dowex 1 -X₂ 100-200 mesh (OH⁻) et éluée par un gradient linéaire eau (5l)-méthanol-eau (6:4)(5l.) Les fractions d'environ 25 ml sont recueillies sur un collecteur de fraction automatique, muni d'un analyseur d'effluent (280 nm) et d'un enregistreur. Dans ces conditions la β -hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- β - adénosine VI est éluee en premier (tubes 170 à 210). Après évaporation à sec, on obtient 0,180 g ($6,1 \cdot 10^{-4}$ mole - 61% sur la base du nucléoside protégé de départ) d'un solide blanc. F : indéterminé (156-158° verre se décomposant lentement au dessus de 200°).

Analyse : C₁₂H₁₇N₅O₄ = 295,3

Calculé % :	C : 48,80	H : 5,80	N : 22,64	O : 21,67
Trouvé % :	48,93	5,97	22,91	21,63
	48,61	5,99	23,01	21,63

Spectre ultra-violet : (C = $6,5 \cdot 10^{-5}$ mole/l dans CH_3OH)

λ_{min} 227 nm, ϵ = 2.000

λ_{max} 260 nm, ϵ = 13.850

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 MC, T.M.S.réf. int.)

H_8 et H_2 , deux singulets, à δ = 8,35 et 8,14 ppm respectivement

NH_2 en 6, singulet, δ = 7,30 ppm

H_1 , pseudo quadruplet à δ = 6,32 ppm; $J_{1,2}$ = 3,6 et 7,5 c/s, largeur de pic = 10 c/s

OH_3' , δ = 4,65 ppm.

H_3' , H_4' et OH_7' , signaux attribués au massif non résolu à δ = 4,28 ppm

2 H_5' , 2 H_6' et 2 H_7 ; massif non résolu, δ = 3,48 ppm

2 H_2' , signaux partiellement recouverts par le signal parasite du DMSO, vers δ = 2,70 ppm.

Dispersion rotatoire (C = 0,23 dans H_{20})

λ (nm)	$\{\alpha\}^{22}$
589	+ 54°4
578	+ 60°7
546	+ 67°5
436	+ 108°4
365	+ 161°6

Chromatographie : couche mince de gel de silice fluorescent Prolabo

CHCl_3 + MeOH (7:3). Une seule tache R_F = 0,50

La β -hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- β -adénosine V est éluée ensuite dans les fractions 222 à 243. Après évaporation à sec, on obtient 0,085 g ($0,28 \cdot 10^{-3}$ mole - 28%) de V solide sous vide, très hygroscopique à l'air

Spectre ultra-violet (C = 10^{-4} M/l dans CH_3OH)

λ_{min} 226 nm, ϵ = 1.100

λ_{max} 260 nm, ϵ = 13.500

Spectre de résonance magnétique nucléaire (DMSO- d_6 , 60 MC, T.M.S.réf.int.)

H_8 et H_2 , deux singulets à δ = 8,42 et 8,18 ppm respectivement

NH_2 , singulet, δ = 7,32 ppm.

H_1 , "pseudo triplet", $J_{1,2}$ = 6,7 c/s, largeur de pic = 13,5 c/s

OH_3' et OH_7' , H_4' , deux massifs partiellement recouverts à δ = 5 et 4,5 ppm.

2 H_5' , 2 H_6' et H_4' , massif non résolu, δ = 3,55 ppm.

2 H_2' , massif partiellement recouvert par le signal parasite du DMSO, vers 2,7 ppm.

2 H_7' , δ = 4,02 ppm.

Dispersion rotatoire ($C = 0,85$ dans H_{20})

nm	$\{\alpha\}^{22}$
589	- 13°5
578	-13°5
546	- 15°6
436	- 29°
365	- 45°5

Dérivé caractéristique : Picrate d'hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- β -adénosine

On dissout 60 mg ($\sim 2.10^{-4}$ mole) du nucléoside dans 1 ml d'eau à 0° et ajoute à cette solution 45 mg d'acide picrique dissout dans 4 ml d'eau également à 0°. On abandonne une heure à cette température, filtre le précipité formé, lave à l'eau et sèche sous vide.

F : indéterminé (60 mg - $1,1.10^{-4}$ mole. 55%).

Analyse : $C_{18}H_{20}N_8O_{11} = 524$

Calculé % :	C : 41,22	H : 3,81	N : 21,37
Trouvé % :	41,26	3,63	21,58

Spectre ultra-violet ($C = 5,4.10^{-5}$ M/l dans CH_3OH)

λ_{min} 233 nm, $\epsilon = 16.700$, λ_{max} 256 nm $\epsilon = 23.000$

λ_{min} 290 nm $\epsilon = 3.120$, λ_{max} 356 nm $\epsilon = 14.150$

Si ce picrate est préparé avec les mêmes proportions de réactifs mais en remplaçant l'eau par le méthanol et en partant à ébullition quelques minutes, la solution dépose au refroidissement 54 mg de fines aiguilles jaunes ($1,6.10^{-4}$ mole - 80%) qui sont des cristaux de picrate d'adénine.

F : indét. L'échantillon analytique a été recristallisé une fois supplémentaire dans l'eau.

Analyse $C_{11}N_7H_8O_7 = 350$

Calculé %	C : 36,28	H : 2,24	N : 30,95
Trouvé %	36,41	2,53	30,76
	36,31	2,61	

Spectre ultra-violet ($6,9.10^{-5}$ mole/l dans CH_3OH)

λ_{min} 231 nm $\epsilon = 13.900$, λ_{max} 254 nm $\epsilon = 18.400$

λ_{min} 292 nm $\epsilon = 2.300$, λ_{max} 354 nm $\epsilon = 13.900$

oooooooooooooooo

B i b l i o g r a p h i e

- 1 - V.P. BUTLER, S.M..BEISER, B.F. ERLANGER, S.W. TANNENBAUM, S. COHEN et A.BENDICH, Proc. Nat. Acad. Sc. U.S. 1962, 48, 1.957
- 2 - S.W. TANNENBAUM et S.M. BEISER, Proc. Nat. Acad. Sc U.S.1963, 49, 662
- 3 - J.X. KHYM ; Biochem., 1963, 2, 334
- 4 - B.F. ERLANGER et S.M. BEISER, Proc. Nat. Acad. Sc.U.S., 1964,52, 68
- 5 - H. SELA, H. UNGAR-WARAN et Y. SCHECHTER, Proc. Nat. Acad.Sc. U.S., 1964, 52, 285
- 6 - H. UNGAR-WARON, E.HURWITZ, J.C.JATON, M. SELA,; Biochem.et Biophys.Acta, 1967, 138, 513
- 7 - P.A. LEVENE and S. TIPSON, J. Biol. Chem. 1935, 109, 623
- 8 - A.M. MICHELSON and A.R. TODD, J. Chem. Society, 1953, p.951
- 9 - J.P. COAT, S. DAVID et J.C. FISCHER, Bull. Soc.Chim. France, 1965, p.2489
- 10 - Jack J. FOX and NAISHUN MILLER, J. Am. Chem. Soc. 1963, 28, 936
- 11 - J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 178
- 12 - S. DAVID et J.C. FISCHER, Bull. Soc. Chim. France, 1967, p. 2148
- 13 - A.M. MICHELSON and A.R. TODD, J. Chem. Soc. 1955, p. 816
- 14 - J.F. CODINGTON, I.L.DOERR, and J.J.FOX, J. Am. Chem. Soc.,1964, 29,558
- 15 - D.M. BROWN, A.R. TODD and S. VARADARAJAN, J. Chem. Soc. 1957, p.868
- 16 - P.A. LEVENE and R.S. TIPSON, J. Biol. Chem. 1934, 106, 113
- 17 - M. CACHIA et H. WAHL, Bull. Soc. Chim. 1958, p. 310
- 18 - G. WEIMANN and H.G. KHORANA, J. Am. Chem. Soc. 1962, 84, 4239
- 19 - C.L. STEVENS, T.S. SULKOWSKI and M.E. MUNK, J. Am. Chem. Soc.,1966,31,4014
- 20 - R.L. LETSINGER, P.S. MILLER and G.W. GRAMS, Tetrahedron Letters,1968,22, 2.624
- 21 - G. CAUQUIS et J.J. BASSELIER, ANN Chim. 1962, 7, 745
- 22 - A. HAMPTON, J. Am. Chem. Soc. 1961, 83, 3.640
- 23 - S.CHADEK and J. SMRT, Coll. Czechoslov. Chem. Comm.,1964, 29, 214.
- 24 - A.M. MICHELSON and A.R. TODD, J. Chem. Soc., 1949, p.2476
- 25 - V.M. CLARK, A.R. TODD and J.ZUSSMAN, J. Chem. Soc., 1951 p.2.952
- 26 - P.M. FROMAGEOT and C.B.REESE, Tetrahedron Letters, 1966,29,3499-3505
- 27 - L.GATLIN and J.C. DAVIS, J. Am. Chem. Soc., 1962,84, 4464-4470
- 28 - P.A.J. GORIN and J.K.N. JONES, Nature, 1953, 172, 1051
- 29 - H. OHLE, E. EULER and R.VOULLIEME, Chem. Ber., 1938, 71, 2250

- 30 - O.T. SCHMIDT, Methods in carbohydrate Chemistry, II p. 321
- 31 - K.FREUDENBERG and A. WOLF, Chem. Ber., 1927, 60, 232
- 32 - E.J. HEDGLEY, W.G. OVEREND and R.A.C. RENNIE, J. Chem. Soc., 1963, p.4701-4711
- 33 - M. CERNY, J. PACAK and V. JENA, Monatsh., 1963, 94, 632
- 34 - M. CERNY and J. PACAK, Coll. Czech. Chem. Comm., 1956, 21, 1003
- 35 - P. SZABO and L. SZABO, J. Chem. Soc., 1964, p. 5139
- 36 - O.N.VARGHA, Chem. Ber., 1929, 62, 2440
- 37 - C. C. BHAT, K.VENKATRAMANA BHAT, AND W. ZORBACH, Carbohyd. Res. 1969, 10; 197-212
- 38 - J. KENNER and G.N. RICHARDS, J. Chem. Soc., 1954, p. 3277
- 39 - W.L. GLEN, GORDON S. MYERS and GORDON A. GRANT, J.Chem.Soc., 1951, p.2568
- 40 - H. UNGAR-WARON, E. HURWITZ, J.C. JATON, M. SELA; Bioch. et Biophys? Acta 1967, 138, 513
- 41 - H.G. GARG, J. Sci. Industr. Res., 1966, 25, 404
- 42 - FISCHER et HELFERICH, b., Ber. dtsh. Chem. Ges., 1914, 47, 210
- 43 - M. PRYSTAS and F. SORM, Coll. Czechoslov. Chem. Comm. 1966, 31, 1053
- 44 - M. PRYSTAS, J. FARKAS and F. SORM, Coll. Czechoslov. Chem. Comm., 1965, 30, 3123
- 45 - H. VENNER ; Chem. Ber., 1960, 93, 140
- 46 - H. VENNER and H. ZINNER, Chem. Ber., 1960, 93, 137
- 47 - S.T.ISHIDO, Y. and SATO, T., Nippon Kagaku Zasshi, 1961, 82, 938. Chem. Abs., 1962, 57, 15.216
- SHIMIDATE, T., Nippon Kagaku Zasshi, 1961, 82, 1268. Chem. Abs.1962,57
16.726
- 48 - W.W. LEE, A.P. MARTINEZ, G.L. TONG and L. GOODMAN, Chem.and Industry, 1963, p. 2007
- 49 - M.J. ROBINS, W.A. BOULES, R.K. ROBINS, J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1251
- 50 - R.L. TOLMAN, R.K. ROBINS, and LEROY B. TOWNSEND, J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 2102
- 51 - C.A. DEKKER, J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 4027
- 52 - H.J. ROBINS and Roland K. ROBINS, J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 4934

Détails expérimentaux généraux

- Tous les solvants ont été éliminés à l'évaporateur rotatif sous vide (12-15 mm Hg) à une température voisine de 35° sauf spécification contraire.

- Les points de fusion, pris sur un appareil Büchi à bain d'huile, ne sont pas corrigés.

- Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été pris sur un spectromètre Jeol à 60 MC à 60°.

- Les spectres infra-rouge ont été pris sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Mod. 437 et les spectres ultra-violet sur "Shimadzu MPS-50-L".

Les pouvoirs rotatoires ont été pris sur un polarimètre Perkin-Elmer.

- Les couches minces de gel de silice ont toutes 0,5 mm d'épaisseur et ont été préparées avec du gel de silice Prolabo, sauf spécification contraire.

- Toutes les analyses ont été effectuées par le Service central de microanalyses du C.N.R.S.

TABLE DES MATIERES

Introduction	page I
<u>Première partie :</u>	
Para-nitrobenzoyl-0-3' thymidine et para-aminobenzoyl-0-3' thymidine	page 3
Para-nitrobenzoyl-0-5' thymidine, para-aminobenzoyl-0-5' thymidine et dérivés	page 13
Diméthyl-2",6" carboxy-4" benzoyl-0-5' thymidine et uridine et leurs dérivés	page 22
Para-nitrobenzoyl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine	page 33
Chlorure de diméthyl-2,6 carbométhoxy-4 benzoyle : réaction sur les nucléosides dans la pyridine	page 34
Para-nitrobenzoyl-N-6 isopropylidène-0-2',3' adénosine et ses dérivés	page 36
<u>Deuxième partie :</u>	
Para-aminophényl-0-5' thymidine et uridine	page 45
Para-acétamidophényl-0-5' uridine	page 47
Para-nitrophényl-0-5' cytidine et dérivés	page 57
Benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine et para-toluènesulfonyl-0-5' benzoyl-N-4 isopropylidène-0-2',3' cytidine	page 57
<u>Troisième partie :</u>	
Para-nitrophényl-0-6 déoxy-3-D-glucose et dérivés,	page 67
Para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-ribose et dérivés	page 70
Para-nitrophényl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose	page 78
Méthyl para-toluènesulfonyl-0-5 déoxy-2-D-riboside et méthyl para-nitrophényl-0-5 déoxy-2-D-riboside	page 82
β -hydroxyéthyl-0-6 méthyl-0-3-D-glucose, β -hydroxy-éthyl-0-5 déoxy-2-D-ribose et dérivés.	page 90
β -hydroxyéthyl-0-5' déoxy-2'- α et β -adénosine et dérivés.	page 100

Introduction	page 1
Part I. The	
1. The	page 1
2. The	page 1
3. The	page 1
4. The	page 1
5. The	page 1
6. The	page 1
7. The	page 1
8. The	page 1
9. The	page 1
10. The	page 1
11. The	page 1
12. The	page 1
13. The	page 1
14. The	page 1
15. The	page 1
16. The	page 1
17. The	page 1
18. The	page 1
19. The	page 1
20. The	page 1
21. The	page 1
22. The	page 1
23. The	page 1
24. The	page 1
25. The	page 1
26. The	page 1
27. The	page 1
28. The	page 1
29. The	page 1
30. The	page 1
31. The	page 1
32. The	page 1
33. The	page 1
34. The	page 1
35. The	page 1
36. The	page 1
37. The	page 1
38. The	page 1
39. The	page 1
40. The	page 1
41. The	page 1
42. The	page 1
43. The	page 1
44. The	page 1
45. The	page 1
46. The	page 1
47. The	page 1
48. The	page 1
49. The	page 1
50. The	page 1
51. The	page 1
52. The	page 1
53. The	page 1
54. The	page 1
55. The	page 1
56. The	page 1
57. The	page 1
58. The	page 1
59. The	page 1
60. The	page 1
61. The	page 1
62. The	page 1
63. The	page 1
64. The	page 1
65. The	page 1
66. The	page 1
67. The	page 1
68. The	page 1
69. The	page 1
70. The	page 1
71. The	page 1
72. The	page 1
73. The	page 1
74. The	page 1
75. The	page 1
76. The	page 1
77. The	page 1
78. The	page 1
79. The	page 1
80. The	page 1
81. The	page 1
82. The	page 1
83. The	page 1
84. The	page 1
85. The	page 1
86. The	page 1
87. The	page 1
88. The	page 1
89. The	page 1
90. The	page 1
91. The	page 1
92. The	page 1
93. The	page 1
94. The	page 1
95. The	page 1
96. The	page 1
97. The	page 1
98. The	page 1
99. The	page 1
100. The	page 1

